



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**VÍAS DE SEÑALAMIENTO QUE  
CONTROLAN LA REORGANIZACIÓN DEL  
CITOESQUELETO DE ACTINA EN  
CÉLULAS DEL EPITELIO PIGMENTADO DE  
LA RETINA : EFECTO DE LA TROMBINA**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE**

**DOCTORA EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A :**

**BIÓL. ARIADNA YOLANDA RUIZ LOREDO**

**DIRECTORA DE TESIS: DRA. ANA MARÍA  
LÓPEZ COLOMÉ**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo se llevó a cabo en la División de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, bajo la asesoría de la Dra. Ana María López Colomé.

La investigación fue parcialmente financiada por donativos otorgados a la Dra. López Colomé, por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, CB-80398), y por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-UNAM, IN200209).

El Comité Tutorial estuvo conformado por las Doctoras: Ana María López Colomé, Claudia González Espinosa y Martha Robles Flores.

El Jurado del Examen de grado estuvo conformado por los Doctores: Alejandro Zentella Dehesa, Alfredo Antonio Ulloa Aguirre, Ana María López Colomé, Erika Patricia Rendón Huerta y Yonathan Omar Garfias Becerra.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Ana María López Colomé, por brindarme la oportunidad de ser parte de su equipo de trabajo, por guiarme en los momentos difíciles, y por la dedicación invertida en beneficio de mi formación profesional.

A los miembros del Comité Tutoral, las Doctoras: Claudia González Espinosa y Martha Robles Flores, por sus valiosas aportaciones cada reunión semestral, y por contribuir con mi formación académica.

A los miembros del Jurado, los Doctores: Alejandro Zentella Dehesa, Alfredo Antonio Ulloa Aguirre, Erika Patricia Rendón Huerta y Yonathan Omar Garfias Becerra, por sus valiosos comentarios y correcciones en la elaboración de esta tesis.

A la Q.F.B. Edith López Hernández y al Dr. José Prisco Palma Nicolás, por su excelente apoyo técnico.

A la Dra. Olga Araceli Patrón Soberano y al Biólogo Gabriel Orozco Hoyuela, por su excelente asesoría durante la obtención de imágenes con el microscopio confocal.

A mi familia y amigos, por su apoyo incondicional.

A la familia Velázquez Ibarra, por su apoyo, generosidad y cariño.

## DEDICATORIA

*A mi mamá:*

*su paciencia, dedicación,  
esfuerzo y amor  
han sido invaluablees  
y me han permitido  
alcanzar mis objetivos.*

*Pa-ra-ti:*

*por ser una fuente inagotable de inspiración,  
impulsarme a emprender cosas nuevas,  
permanecer a mi lado aún en los momentos adversos,  
y llenarme de alegría.*

# ÍNDICE

<b>Abreviaturas</b>	1
<b>Resumen</b>	3
<b>Abstract</b>	5
<b>1. Introducción</b>	
<b><i>El sistema visual de los vertebrados</i></b>	6
<b><i>El epitelio pigmentado de la retina (EPR)</i></b>	7
<i>Estructura</i>	8
<i>Función</i>	8
<i>Participación del EPR durante el desarrollo de enfermedades retinianas</i>	11
<b><i>El citoesqueleto de actina</i></b>	12
<i>Señalamiento y generación de fuerza mecánica</i>	13
<b><i>La miosina II</i></b>	14
<i>Mecanismos moleculares que regulan la función de la miosina II no muscular</i>	16
<i>Vías de señalamiento que controlan la fosforilación-desfosforilación de la cadena ligera de la miosina (MLC)</i>	17
El papel de las cinasas de proteína	17
La fosfatasa de la MLC	18
<i>Activación de la miosina II no muscular en procesos patológicos</i>	19
<b><i>La trombina y los receptores activados por proteasas</i></b>	20
<i>Estructura de la trombina</i>	20
<i>Los receptores activados por proteasas (PARs)</i>	21
<i>Vías de señalamiento activadas por la trombina</i>	24
Participación de la proteína cinasa C (PKC)	25
<b>2. Planteamiento del problema</b>	27
<b>3. Hipótesis</b>	28

<b>4. Objetivo general</b>	28
<b><i>Objetivos particulares</i></b>	28
<b>5. Metodología</b>	
<b><i>Reactivos</i></b>	30
<b><i>Cultivo primario de EPR de rata</i></b>	30
<b><i>Protocolos de estimulación o inhibición farmacológica</i></b>	31
<b><i>Inhibición específica de la PKC<math>\delta</math> y de la PKC<math>\epsilon</math></i></b>	31
<b><i>Inmunodetección con anticuerpos (Western blot)</i></b>	32
<b><i>Ensayo de activación de RhoA</i></b>	32
<b><i>Inmunofluorescencia para F-actina</i></b>	33
<b><i>Análisis estadístico</i></b>	33
<b>6. Resultados</b>	
<b><i>Efecto de la trombina sobre la fosforilación de la MLC</i></b>	34
<b><i>Vías de señalamiento que controlan la fosforilación de la MLC inducida por trombina</i></b>	35
<b><i>Participación de la vía Rho/Rho-cinasa (ROCK)</i></b>	35
<b><i>Activación de la cinasa de la MLC dependiente de Ca<sup>2+</sup>/calmodulina (MLCK)</i></b>	37
<b><i>El papel de las isoformas de la PKC</i></b>	38
<b><i>PKC convencionales y nueva (<math>\delta</math>)</i></b>	38
<b><i>PKC atípica (<math>\zeta</math>)</i></b>	42
<b><i>Fosforilación de la proteína CPI-17</i></b>	43
<b><i>Efecto de la trombina sobre la formación de fibras de estrés de actina</i></b>	46
<b>7. Discusión</b>	
<b><i>Intervención de la trombina en la patogénesis del EPR</i></b>	51
<b><i>Análisis de las vías de señalamiento involucradas en el control del citoesqueleto</i></b>	52
<b><i>Participación de ROCK y de la MLCK</i></b>	52
<b><i>Activación de las isoformas de la PKC y su proteína efectora CPI-17</i></b>	54
<b><i>Transformación fenotípica de las células del EPR</i></b>	59

<b>8. Conclusiones</b>	62
<b>9. Referencias bibliográficas</b>	64
<b>10. Artículo</b>	85



## ABREVIATURAS

ABP	Proteína de unión a la actina
Akt	Proteína cinasa B
AMP	Monofosfato de adenosina
AMPK	Proteína cinasa activada por AMP
CaM	Calmodulina
CNTF	Factor neurotrófico ciliar
CPI-17	Proteína inhibidora de PP1 potenciada por la PKC de 17 kDa
aPKC	PKC atípicas
cPKC	PKC convencionales
nPKC	PKC nuevas
DAG	Diacilglicerol
DAPK	Proteína cinasa asociada a la muerte
ELC	Cadena ligera esencial de la miosina
EPR	Epitelio pigmentado de la retina
ERM	Ezrina/radixina/moesina
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
GAP	Proteína activadora de GTPasas
GBPI	Inhibidor de la fosfatasa de intestino y cerebro
GDI	Inhibidor de la disociación de nucleótidos de guanina
GEF	Factor de intercambio de nucleótidos de guanina
GPCR	Receptor acoplado a proteínas G
IGF	Factor de crecimiento semejante a la insulina
IL	Interleucina
ILK	Cinasa asociada a integrinas
IP <sub>3</sub>	Inositol 1,4,5-trifosfato
KEPI	Inhibidor de PP1 potenciado por cinasas
LIMK	Cinasa Lin11, Isl1 y Mec3
M20	Subunidad pequeña, de 20 kDa
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos
mDia	Proteína homóloga de <i>Drosophila</i> diaphanous
MEK	MAPK cinasa
MerTK	Receptor con actividad de cinasa de residuos de tirosina Mer
MHC	Cadena pesada de la miosina

MLC	Cadena ligera reguladora de la miosina
MLCK	Cinasa de la MLC dependiente de Ca <sup>2+</sup> /calmodulina
MLCP	Fosfatasa de la MLC
MRCK	Cinasa de unión a Cdc42 relacionada con la cinasa de la distrofia miotónica
MYPT1	Subunidad blanco de la fosfatasa de la miosina 1
NM-II	Miosina II no muscular o citoplásmática
p70 <sup>S6K</sup>	Proteína cinasa ribosomal S6 de 70 kDa
PAK	Cinasa activada por p21
PAR	Receptor activado por proteasas
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PEDF	Factor derivado del epitelio pigmentado
PHI-1	Inhibidor 1 de la holoenzima fosfatasa
PI3K	Fosfatidilinositol 3'-cinasa
PIP <sub>3</sub>	Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato
PKC	Proteína cinasa C
PL	Fosfolipasa
PP1c	Proteína fosfatasa de tipo 1, subunidad catalítica
Raf-1	MAPK cinasa cinasa
ROCK	Cinasas de residuos de serina/treonina Rho-cinasa/ROK $\alpha$ /ROCK-II y p160ROCK/ROCK $\beta$
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante $\beta$
TIMP	Inhibidor tisular de metaloproteinasas de matriz
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral $\alpha$
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial
VRP	Vitreorretinopatía proliferativa
ZIP cinasa	Proteína cinasa de interacción con cierres de leucina

## RESUMEN

El epitelio pigmentado de la retina (EPR) desempeña un papel esencial en el mantenimiento de la función visual. La alteración de las funciones del EPR en numerosos procesos patológicos produce la degeneración de la retina neural y la pérdida de la visión. En este contexto, las enfermedades de tipo fibroproliferativo de la retina involucran la ruptura de la barrera hematorretiniana, lo que permite a la trombina contenida en el suero sanguíneo entrar en contacto directo con la retina neural y con el EPR. La trombina ejerce sus efectos en las células a través de receptores acoplados a proteínas G, denominados receptores activados por proteasas (PARs). El receptor PAR-1, el prototipo de esta familia, está acoplado a miembros de las proteínas  $G_q$ ,  $G_i$  y  $G_{12/13}$ , permitiendo a la trombina regular numerosos procesos tanto fisiológicos como patológicos. Entre las respuestas originadas por la estimulación del receptor PAR-1 se encuentran aquellas que promueven la formación de fibras de estrés de actina, cuya contracción se ha asociado con una gran variedad de padecimientos. Específicamente, la generación de fuerza mecánica en la célula depende de la fosforilación de la cadena ligera de la miosina II (MLC), evento que favorece la unión de la miosina con la F-actina, a la vez que induce la actividad de ATPasa de la miosina, proporcionando la energía necesaria para la contracción. A pesar de su importancia en el control de la motilidad celular, se sabe muy poco acerca de las vías de señalamiento que regulan la fosforilación de la MLC en células del EPR y que podrían contribuir con el establecimiento de trastornos oculares. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo consistió en analizar el efecto de la trombina sobre la reorganización del citoesqueleto de actina de células del EPR de rata en cultivo, así como investigar las posibles vías de transducción involucradas.

Los resultados mostraron que la trombina induce la fosforilación de la MLC en el EPR de rata de manera dependiente del tiempo y de la dosis a través del receptor PAR-1. Mediante el uso de distintos inhibidores farmacológicos, los datos obtenidos indicaron que el efecto de la trombina se debió a la activación de múltiples vías de señalamiento, las cuales convergen en la fosforilación de la MLC. Por una parte, la GTPasa RhoA activa a ROCK, que al inhibir a la fosfatasa de la MLC (MLCP), permite que aumente el nivel de fosfo-MLC. Paralelamente, la PLC $\beta$  induce la hidrólisis de fosfoinosítidos, lo cual resulta en la liberación de  $Ca^{2+}$  intracelular mediada por el IP $_3$  y en la formación de DAG. La elevación de la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  promueve la activación de la CaM/MLCK, cinasa que incrementa la fosforilación de la MLC. Adicionalmente, el DAG y el aumento de  $[+Ca^{2+}]_i$  activan a las isoformas convencionales y nueva ( $\delta$ ) de la PKC, mientras que las subunidades  $G_{\beta\gamma}$  controlan la activación de la PKC $\zeta$  a través de una vía dependiente de PI3K. Miembros pertenecientes a todas las clases de la PKC pueden fosforilar a la proteína CPI-17 en el aminoácido Thr38, convirtiéndola en un potente inhibidor de la MLCP y, en consecuencia,

aumentando el nivel de la MLC fosforilada. Finalmente, se demostró que el efecto de la trombina sobre la fosforilación de la MLC induce la formación de fibras de estrés de actina, ya que este evento se bloqueó al inhibir a las enzimas que controlan la fosforilación de la MLC.

En conjunto, estos resultados indican que el ensamble de filamentos contráctiles de actina-miosina inducido por la trombina puede alterar el funcionamiento normal de las células del EPR en condiciones en las que se rompe la barrera hematorretiniana, y por lo tanto, podría contribuir al desarrollo de enfermedades de tipo proliferativo de la retina.

## ABSTRACT

The retinal pigment epithelium (RPE) plays an essential role in the function of the neural retina and the maintenance of vision. In fact, the death of retinal neurons in blinding diseases is mostly secondary to RPE dysfunction. On this line, most retinal diseases involve blood-retinal barrier breakdown, whereupon thrombin contained in serum directly contacts the RPE. Thrombin-stimulated intracellular signaling is mediated by the G protein-coupled receptors called proteinase-activated receptors (PARs). PAR-1, the prototype of this family, couples to members of the  $G_{q/11}$ ,  $G_i$  and  $G_{12/13}$  classes, allowing thrombin to regulate a number of physiological and pathological processes. Among the responses elicited by PAR-1 stimulation are those involving actin stress fiber assembly; moreover, the contraction of these fibers is critically involved in various pathological states. Contractile processes in non-muscle cells are triggered by the phosphorylation of the myosin II light chains (MLCs), which activates myosin  $Mg^{2+}$ -ATPase, leading to binding of myosin to F-actin and providing the energy required to drive filament sliding. Although it is known that non-muscle myosin II controls force generation within the cells through phosphorylation of MLCs, its participation in the modulation of pathological processes in the RPE remains largely undefined. In order to analyze the potential role for thrombin in RPE cell dysfunction, the effects of thrombin on the signaling pathways leading to MLC phosphorylation and actin stress fiber formation in primary cultures of rat RPE cells were studied. The results showed that thrombin induces time- and dose-dependent phosphorylation of MLC through PAR-1 signaling. By using pharmacological inhibitors, it was shown that thrombin triggers a complex signaling network in rat RPE cells, in which the distinct pathways converge on MLC phosphorylation. Specifically, thrombin stimulation of Rho GTPase activates ROCK, which in turn inhibits MLC phosphatase (MLCP) by phosphorylation of its targeting subunit (MYPT1), leading to a significant increase in phospho-MLC level. In concert,  $PLC\beta$  activation results in  $IP_3$ -mediated calcium mobilization and DAG formation. The increase in intracellular  $Ca^{2+}$  promotes CaM/MLCK activation, leading to MLC phosphorylation. Moreover, while DAG and  $[Ca^{2+}]_i$  lead to the activation of conventional and novel ( $\delta$ ) PKC isoforms,  $G_{\beta\gamma}$  subunits control atypical PKC activation through PI3K-dependent signaling. Members of all PKC subfamilies phosphorylate CPI-17 at Thr38, turning this protein into a potent MLCP inhibitor, and increasing the level of phosphorylated MLC. Finally, it was demonstrated that thrombin effect on the MLCs induces actin stress fiber formation, since this event was prevented by inhibiting the pathways leading to MLC phosphorylation.

It is concluded that thrombin stimulation of MLC phosphorylation and actin stress fiber formation may be involved in RPE cell dysfunction following blood-retinal barrier disruption, and hence, could participate in the onset of proliferative retinal diseases.

## 1. INTRODUCCIÓN

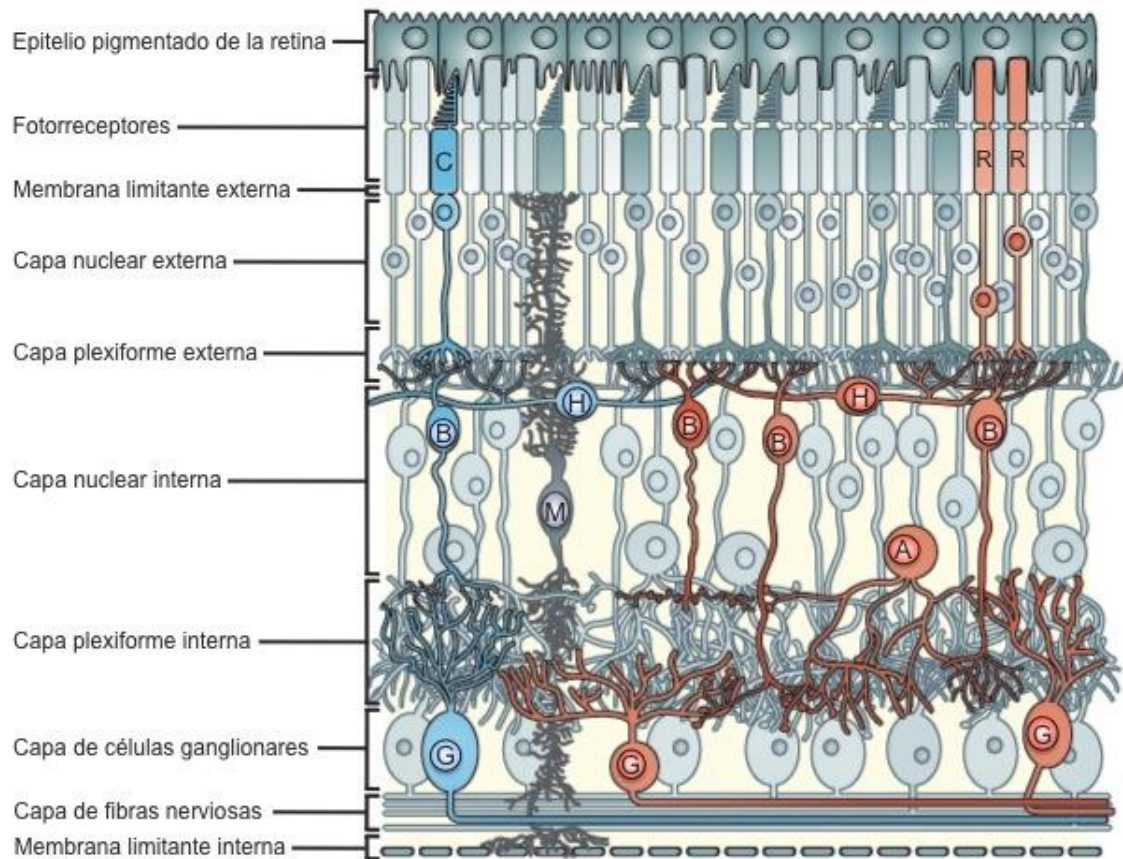
### ***El sistema visual de los vertebrados***

La luz ha favorecido el desarrollo de estructuras visuales en la mayoría de las especies de animales que existen actualmente en la Tierra (Fernald, 2004). En los vertebrados, el proceso de la visión inicia en la retina, un tejido estratificado que abarca en su totalidad la parte interna del globo ocular y cuya función consiste en convertir los fotones en señales electroquímicas que se envían hacia centros específicos en el cerebro para procesar una imagen (Swaroop et al., 2010).

La retina de los mamíferos tiene una organización laminar en la que se distinguen varios tipos celulares, entre los que se incluyen células epiteliales, neuronas, células vasculares y macroglía (Runkle y Antonetti, 2011). Los componentes neuronales de la retina se clasifican en: 1) fotorreceptores (conos y bastones), que convierten la luz en una señal electroquímica; 2) interneuronas (células bipolares, horizontales y amacrinas), que procesan e integran la información transmitida por los fotorreceptores; y 3) células ganglionares, cuyos axones forman el nervio óptico que se dirige hacia los centros visuales del cerebro (Swaroop et al., 2010).

La estructura laminar de la retina se observa en la Figura 1. La capa externa está formada por el epitelio pigmentado de la retina, el cual describiremos en la siguiente sección. La segunda capa incluye los segmentos externos e internos de los fotorreceptores, cuyos cuerpos celulares forman la capa nuclear externa. A ésta le sigue la capa plexiforme externa, en donde los fotorreceptores establecen sinapsis con las células bipolares y horizontales. A su vez, los cuerpos celulares de las células bipolares, horizontales y amacrinas constituyen la capa celular interna. Las células bipolares transmiten la información a las células ganglionares de manera directa, o indirecta a través de las células amacrinas, en la capa plexiforme interna. La siguiente capa contiene, además de los cuerpos celulares de las neuronas ganglionares, células amacrinas desplazadas. La última capa, denominada de fibras nerviosas, comprende los axones de las células ganglionares (Swaroop et al., 2010; Wallace, 2011).

Adicionalmente, se han descrito dos tipos de macroglía en la retina de los mamíferos: las células de Müller y los astrocitos. Las células de Müller se extienden desde la membrana limitante interna hasta la membrana limitante externa, atravesando de manera radial al tejido neural. Sus cuerpos celulares se localizan en la capa nuclear interna, mientras que sus procesos laterales se expanden en las capas plexiformes, envolviendo a las sinapsis (de Melo Reis et al., 2008; Wallace, 2011). En las retinas vascularizadas los astrocitos forman una densa red, cuyos cuerpos y procesos celulares se ubican principalmente en la capa de fibras nerviosas y en estrecha asociación con los capilares sanguíneos (Wallace, 2011).



**Figura 1. Estructura laminar de la retina.** A, células amacrinas; B, células bipolares; C, conos; G, células ganglionares; H, células horizontales; M, glía de Müller; R, bastones. Imagen modificada de Swaroop et al., 2010.

***El epitelio pigmentado de la retina (EPR)***

En el ojo de los vertebrados, el epitelio pigmentado de la retina (EPR) constituye un tejido esencial para las células visuales, ya que les provee de un soporte metabólico y funcional. Entre las múltiples tareas que desempeña el EPR se cuentan: absorción de la luz dispersada y protección contra la foto-oxidación; fagocitosis de los segmentos externos de los fotorreceptores; transporte y metabolismo de los retinoides; control del volumen y composición del espacio subretinal; mantenimiento de la adhesión retinal; síntesis y secreción de factores de crecimiento y citocinas; y conservación del ojo como un sitio inmunológicamente privilegiado, entre otras (Simó et al., 2010; Strauss, 2005). Debido a la estrecha interacción del EPR con las células visuales, la alteración de cualquiera de estas funciones puede conducir a la degeneración de la retina y a la subsecuente pérdida de la visión (Sparrow et al., 2010; Strauss, 2005).

### *Estructura*

El EPR está compuesto por una monocapa de células poligonales quiescentes situada entre los fotorreceptores de la retina y la coroides, una estructura vascular densamente empacada (Sparrow et al., 2010; Strauss, 2005). Este tejido se desarrolla a partir del neuroectodermo, el cual se evagina de las paredes laterales del diencéfalo para crear las vesículas ópticas. Posteriormente, las vesículas se invaginan para crear la copa óptica, una estructura bi-laminar. La capa interna formará la retina neural, mientras que la capa externa se diferenciará en un epitelio secretor (Furhmann, 2010). Como su nombre lo indica, las células del EPR generalmente contienen melanina, un pigmento que se almacena en gránulos citoplasmáticos denominados melanosomas. La maduración de estas células comienza con la síntesis de la tirosinasa, enzima que cataliza la conversión de la L-tirosina a melanina (Sparrow et al., 2010).

Las células del EPR están polarizadas en un dominio apical (dirigido hacia los fotorreceptores) y en un dominio baso-lateral (dirigido hacia la coroides). La cara apical cuenta con numerosas microvellosidades que envuelven parcialmente a los segmentos externos de los fotorreceptores; en tanto que la cara basal tiene pequeñas invaginaciones que incrementan la superficie de absorción y secreción del epitelio y está en contacto directo con la membrana de Bruch, un tejido conectivo acelular que separa al EPR del endotelio fenestrado de los coriocapilares (Marmor, 1998; Strauss, 2005).

Cerca de la región apical se ubica la *zonula occludens*, formada por uniones estrechas. Estas uniones no sólo permiten al EPR formar la parte externa de la barrera hematorretiniana, sino que contribuyen a establecer la polaridad epitelial al regular la distribución asimétrica de proteínas y lípidos entre los compartimientos apical y baso-lateral (Burnside y Bost-Usinger, 1998). Por ejemplo, la ATPasa de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , los intercambiadores de  $\text{Na}^+-\text{H}^+$  y de  $\text{Na}^+-\text{HCO}_3^-$ , la ezrina, la integrina  $\alpha\beta 5$  y morforeguladores como la molécula de adhesión de células neurales 140 (N-CAM-140) se localizan en la membrana apical; en contraste, proteínas como el transportador de intercambio de  $\text{Cl}^--\text{HCO}_3^-$ , la bestrofina y la integrina  $\alpha 1\beta 3$  están en el dominio baso-lateral (Marmor, 1998; Sparrow et al., 2010; Strauss, 2005). Además de la *zonula occludens*, células contiguas del EPR presentan uniones adherentes (*zonula adherens*) y desmosomas, involucrados en mantener la adhesión intercelular y la estructura en monocapa del epitelio (Marmor, 1998; Spaide y Yanuzzi, 1998).

### *Función*

A continuación se describen brevemente las principales funciones del EPR:



♦Absorción de la energía luminosa. La absorción del exceso de luz por la melanina contenida en el EPR contribuye a incrementar la calidad visual al impedir el reflejo de luz en el fundus y al proteger a los fotorreceptores (Strauss, 2005).

♦Fagocitosis de los segmentos externos de los fotorreceptores. Las células visuales presentan 3 regiones funcionales: 1) los segmentos externos, formados por un sistema de discos membranosos que contienen a la rodopsina, la molécula encargada de captar la luz; 2) los segmentos internos, que contienen al núcleo celular y a la maquinaria sintética; y 3) una terminal sináptica (Kandel et al., 2000). Los fotorreceptores están continuamente expuestos a la energía radiante y al oxígeno, factores que promueven la formación de radicales libres que dañan sus componentes proteicos y lipídicos. Para mantener la estructura de las células fotosensibles en condiciones óptimas, los discos contenidos en el segmento externo de los fotorreceptores se renuevan de manera constitutiva, desde el segmento interno, lo que desplaza a los discos viejos hacia la punta de los fotorreceptores. Estos discos viejos, que contienen la mayor cantidad de moléculas dañadas, se desprenden de las células visuales para ser fagocitadas y digeridas por el EPR. Adicionalmente, las células del EPR cuentan con sistemas antioxidantes que protegen a las células visuales de la foto-oxidación (Marmor, 1998; Strauss, 2005).

♦Re-isomerización del 11-*cis*-retinal. La interacción entre los fotorreceptores y el EPR es fundamental durante el ciclo visual, cuyo propósito consiste en regenerar el 11-*cis*-retinal, el cromóforo que forma parte de la rodopsina. El ciclo se inicia en los discos de los fotorreceptores, donde la luz causa la isomerización del 11-*cis*-retinal a *all-trans*-retinal. Este proceso activa a la opsina, que a su vez activa a la transducina (proteína G<sub>t</sub>) en el siguiente paso de la cascada fototransdutora. Una vez inactiva, la opsina libera el *all-trans*-retinal; sin embargo, los fotorreceptores no cuentan con un sistema para la re-isomerización del cromóforo, que entonces se reduce a *all-trans*-retinol. Este compuesto se transporta hacia el EPR, en donde regresa a la configuración 11-*cis* mediante la acción de la enzima RPE65, una isomerohidrolasa que se expresa de manera abundante en este tejido. Finalmente, el 11-*cis*-retinal se reenvía a los fotorreceptores, completando el ciclo (Sparrow et al., 2010).

♦Transporte vectorial. El EPR contribuye a mantener el microambiente apropiado para la función normal de las células visuales. Para ello, transporta nutrientes hacia los fotorreceptores, facilita la eliminación de agua y catabolitos, y controla la concentración iónica del espacio subretinal. Estos procesos dependen de la actividad de varias proteínas transportadoras y canales iónicos (K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> y Ca<sup>2+</sup>) en la membrana del EPR. Por ejemplo, nutrientes como la glucosa, el retinol, el ácido

ascórbico y ácidos grasos poli-insaturados se transportan selectivamente desde la coroides hacia los fotorreceptores (Simó et al., 2010; Strauss, 2005). En contraste, el EPR transporta agua y electrolitos desde el espacio subretinal hacia el tejido vascular. La remoción de agua es particularmente importante, ya que se produce de manera abundante en la retina debido a la alta actividad metabólica de las neuronas y de las células gliales, así como a la presión intraocular, que mueve agua del humor vítreo hacia la retina. El flujo de agua a través del EPR depende principalmente del transporte de  $K^+$  y  $Cl^-$ , mediado por un co-transportador apical de  $Na^+-K^+-2Cl^-$  y por un canal de  $Cl^-$  localizado en el dominio baso-lateral (Strauss, 2005). Se sabe que la concentración de  $K^+$  en el espacio subretinal disminuye significativamente cuando los fotorreceptores reciben estímulos luminosos. El EPR compensa la reducción del nivel de este ion a través de canales de  $K^+$  rectificadores de entrada localizados en la membrana apical (Wimmers et al., 2007).

♦Adhesión retinal. La unión de la retina con el EPR es central para la visión, ya que una retina desprendida no puede registrar las imágenes enfocadas, y los fotorreceptores finalmente degenerarían debido a la falta de nutrientes y otros factores derivados del EPR (Marmor, 1998). Los mecanismos a través de los cuales las células de este epitelio favorecen la adhesividad retinal incluyen: la inter-digitación de las microvellosidades del EPR con los segmentos externos de los fotorreceptores; el transporte activo de agua en dirección retina-coroides; y la regulación del estado metabólico de la matriz interfotorreceptora (Marmor, 1998).

♦Mantenimiento del ojo como un sitio inmunológicamente privilegiado. El ojo se considera un órgano con privilegio inmunológico, y el EPR desempeña un papel primordial en el mantenimiento de este estado. Primero, la formación de uniones estrechas entre células contiguas del EPR permiten a este tejido constituir la parte externa de la barrera hematorretiniana, la cual impide el acceso de células sanguíneas y de proteínas plasmáticas al interior del ojo a la vez que regula el paso de iones y solutos a través de la vía paracelular (Sparrow et al., 2010; Runkle y Antonetti, 2011). Además, el EPR expresa de manera constitutiva diversas moléculas inmunosupresoras, como el Fas-ligando, el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), la trombospondina, miembros de la familia B7, la galectina 1, el factor derivado del epitelio pigmentado (PEDF) y el antagonista del receptor de la interleucina 1a (Holtkamp et al., 1999; Ishida et al., 2003; Usui et al., 2008; Zamiri et al., 2006).

♦Síntesis y secreción de factores de crecimiento y citocinas. Evidencia considerable indica que las células del EPR producen y secretan una gran variedad de ligandos solubles que modulan el

desarrollo embrionario, se requieren para mantener la integridad estructural de la retina y de los coriocapilares, y participan durante la respuesta a un daño (Strauss, 2005). Dichas moléculas incluyen: el PEDF, el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el TGF- $\beta$ , el factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF), el factor neurotrófico ciliar (CNTF), miembros de la familia de las interleucinas (IL), quimiocinas, el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), la somatostatina, la eritropoyetina, y diferentes tipos de inhibidores tisulares de metaloproteinasas de matriz (TIMPs) (Campochiaro, 1998; Simó et al., 2010).

En circunstancias normales, resalta el papel del PEDF y del VEGF. En el lado apical, el PEDF actúa como neuroprotector contra la apoptosis inducida por glutamato o por hipoxia, mientras que en la región baso-lateral funciona como un factor anti-angiogénico. Por otro lado, el VEGF se requiere para el desarrollo apropiado de la vasculatura de la retina, y en el adulto funciona como un factor trófico que estabiliza a las células endoteliales de los coriocapilares (Simó et al., 2010).

La secreción de estos factores cambia como respuesta a un daño, por ejemplo, estimulando la secreción de factores neuroprotectores como el FGF y el CNTF. Sin embargo, esta alteración puede inducir procesos de vascularización o cicatrización anormales, implicados en el desarrollo de enfermedades de la retina (Campochiaro, 1998; Strauss, 2005). En este contexto, es importante mencionar que el EPR contiene receptores para numerosos agentes, como neurotransmisores, hormonas, moléculas de adhesión, factores de crecimiento y mediadores inflamatorios, los cuales modulan la función de las células del EPR (Marmor, 1998).

#### *Participación del EPR en el desarrollo de enfermedades de la retina*

La alteración de la función normal de las células del EPR se ha relacionado con el desarrollo de varias patologías que conducen a la pérdida de la visión, entre las que se incluyen distrofias retinianas, enfermedades coroidales y desórdenes de tipo fibro-proliferativo (Marmor, 1998; Sparrow et al., 2010).

Las distrofias retinianas agrupan trastornos hereditarios que se caracterizan por la pérdida progresiva de los fotorreceptores. En algunos casos, su desarrollo se debe a mutaciones que afectan la expresión de genes clave en el EPR. Por ejemplo, mutaciones en los genes que codifican proteínas necesarias para la regeneración del 11-*cis*-retinal causan amaurosis congénita de Leber y algunas formas de retinosis pigmentaria (Thompson y Gal, 2003); mientras que mutaciones que alteran a la bestrofina, un canal iónico permeable al Cl<sup>-</sup>, producen distrofia macular viteliforme (Hartzell et al., 2008). La degeneración de la retina también se asocia con la expresión deficiente de MerTK, un receptor involucrado en la fagocitosis de los segmentos externos de los fotorreceptores (Gal et al., 2000).

Por otra parte, la pérdida del tejido constituido por el EPR es clave durante el desarrollo de la degeneración macular relacionada con la edad (Nowak, 2006). La complicación más severa de esta enfermedad, así como de la retinopatía diabética proliferativa, consiste en la neovascularización subretinal. La formación de nuevos vasos depende principalmente de un aumento en la concentración de VEGF, el cual es secretado por el EPR bajo condiciones hipóxicas (Simó et al., 2010; Witmer et al., 2003).

Aunque las células del EPR son estacionarias y mitóticamente inactivas, retienen la capacidad de proliferar y de migrar como respuesta a un daño. Esta capacidad regenerativa puede tener efectos adversos, como se observa en la vitreorretinopatía proliferativa (VRP), un proceso de cicatrización inapropiado que se desarrolla en algunos pacientes (10-40%) con desprendimiento de retina (Kirchhof, 2004). Durante el desarrollo de la enfermedad, las células del EPR se desprenden de su monocapa polarizada y migran hacia el espacio subretinal y la cavidad vítrea, donde forman membranas contráctiles que ocasionan nuevos desprendimientos de la retina y la pérdida de la visión (Kirchhof, 2004; Pastor et al., 2002). Esta reacción fibrótica involucra la migración, proliferación y transformación de las células del EPR, que adquieren un fenotipo mio-fibroblástico a través de la transición epitelio-mesénquima (Saika et al., 2008; Sparrow et al., 2010). El reinicio de la división celular se ha relacionado con la falta de adhesión entre el EPR y los fotorreceptores, así como entre células adyacentes del EPR (Campochiaro et al., 1997; Pastor et al., 2002). Adicionalmente, varios autores han resaltado la ruptura de la barrera hematorretiniana como un factor clave para el establecimiento de la enfermedad. En estas condiciones, las células del EPR entran en contacto con factores de crecimiento y otros mediadores inflamatorios contenidos en el suero sanguíneo, los cuales inducen la proliferación y migración de las células (Campochiaro et al., 1997; Nagasaki et al., 1998).

Como ya se mencionó, una de las características principales de los trastornos fibróticos en el ojo es la transformación de las células, la cual involucra la remodelación del citoesqueleto de actina, así como la generación de fuerza mecánica por parte de las miosinas. Revisaremos estos procesos en las siguientes secciones.

### ***El citoesqueleto de actina***

El citoesqueleto de actina, una red dinámica compuesta por filamentos de actina y una gran variedad de proteínas accesorias, desempeña un papel central en diversos procesos que son esenciales para la sobrevivencia de la célula. La habilidad de la actina para asociarse de manera reversible en forma de polímeros largos y flexibles, así como la organización de estos filamentos en estructuras de mayor complejidad, provee a las células con un sistema de andamiaje que mantiene la morfología celular, controla la adhesión a otras células y substratos, regula la

localización intracelular de componentes citoplasmáticos, y permite la generación de fuerza mecánica (Allingham et al. 2006; Goley y Welch, 2006; Schmidt y Hall, 1998).

En el citoplasma, la actina existe en forma monomérica (G-actina), o como un polímero (F-actina). Análisis estructurales muestran que cada monómero está formado por dos lóbulos separados por una hendidura. En la parte superior de la hendidura se une un nucleótido de adenina (ADP o ATP), mientras que en la parte inferior se unen proteínas reguladoras (Dominguez y Holmes, 2011). Aunque la polimerización no requiere de gasto de energía, se ha observado que la ATP-actina se ensambla de manera más rápida que la ADP-actina (Schmidt y Hall, 1998). Dentro del filamento, todas las subunidades se orientan hacia la misma dirección, creando una estructura polarizada en la que el extremo que contiene el sitio de unión al nucleótido de adenina se denomina como menos (-), debido a que se ensambla con una velocidad menor que el extremo más (+). Bajo condiciones fisiológicas, los microfilamentos y la actina monomérica se mantienen en equilibrio dinámico mediante el proceso conocido como "treadmilling" (Carlier et al., 1998; Schmidt y Hall, 1998). La adición de una molécula de ATP-G-actina al extremo más induce la hidrólisis del ATP, promoviendo un cambio conformacional en el filamento que favorece la disociación de un monómero del extremo menos (Revenu et al., 2004).

El ensamble y desensamble de los filamentos de actina, así como la asociación de los microfilamentos en estructuras especializadas, dependen de la acción de un gran número de proteínas de unión a la actina (ABPs). Estas proteínas interactúan directamente con los monómeros o con los filamentos, regulando la dinámica del citoesqueleto de actina (Goley y Welch, 2006; Revenu et al., 2004). Por ejemplo, algunas ABPs inician la formación de filamentos nuevos (nucleación), mientras que otras causan su fragmentación. La célula también cuenta con proteínas que se asocian al extremo más, previniendo la subsecuente elongación o pérdida de las subunidades. Existen ABPs que regulan la adición de los monómeros al secuestrar a la G-actina, o al facilitar el intercambio de ADP por ATP. Finalmente, otras ABPs tienen la capacidad de entrecruzar a los microfilamentos, formando haces o redes (Allingham et al., 2006; Revenu et al., 2004; Schmidt y Hall, 1998).

### *Señalamiento y generación de fuerza mecánica*

Las señales extracelulares que inducen la reorganización del citoesqueleto de actina dentro de la célula se transmiten principalmente a través de las GTPasas Rho, cuyos miembros pertenecen a la superfamilia Ras de proteínas G monoméricas. Estas GTPasas varían entre dos estados conformacionales: uno activo, en el cual están unidas a GTP, y uno inactivo, en el cual se unen a GDP. Tres clases de proteínas regulan este ciclo: 1) factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEFs), que promueven la activación al catalizar el cambio de GDP por GTP; 2) proteínas

activadoras de GTPasas (GAPs), que median la desactivación al estimular la hidrólisis de GTP; y 3) inhibidores de la disociación de nucleótidos de guanina (GDIs), que actúan como reguladores negativos al unirse a la conformación inactiva, impidiendo el intercambio de GDP por GTP (Sah et al., 2000). Aunque se han descrito 25 GTPasas Rho, los miembros mejor caracterizados incluyen a RhoA, Rac1 y Cdc42. RhoA induce la formación de fibras de estrés de actina y complejos de adhesión focal; mientras que Rac1 y Cdc42 promueven el ensamble de lamelipodios y filopodios, respectivamente (Wennerberg y Der, 2004).

La generación de fuerza en las células no musculares depende de la contracción de fibras de estrés de actina, haces compuestos por filamentos de actina (10-30) entrecruzados por moléculas de  $\alpha$ -actinina y miosina II (Naumanen et al., 2007; Pellegrin y Mellor, 2007). Las fibras de estrés se unen a la membrana plasmática mediante las adhesiones focales, complejos multimoleculares en donde las integrinas permiten la interacción entre los componentes de la matriz extracelular y el citoesqueleto de actina (Kanchanawong et al., 2010). El mecanismo a través del cual RhoA induce la formación de fibras de estrés de actina involucra a la proteína homóloga de *Drosophila* diaphanous (mDia) y a las cinasas de residuos de serina/treonina Rho-cinasa/ROK $\alpha$ /ROCK-II y p160ROCK/ROCK $\beta$ , que nombraremos genéricamente ROCK. Una vez activa, mDia se une al extremo más de los filamentos de actina, donde permite la adición de monómeros a la vez que previene la unión de proteínas que impiden la elongación. Además, mDia promueve la formación de filamentos nuevos en los sitios de adhesión focal (Hall, 2005; Pellegrin y Mellor, 2007). Por otra parte, ROCK fosforila varios substratos que regulan el ensamble y la contracción de las fibras de estrés, como la cadena ligera de la miosina (MLC), la cual describiremos en la siguiente sección; las cinasas Lin11, Isl1 y Mec3 (LIMKs), que inhiben a la cofilina, una proteína que despolimeriza los filamentos de actina; la aducina, que estimula la formación de redes compuestas por espectrina-actina; y el complejo conformado por las proteínas ezrina/radixina/moesina (ERM), que entrecruza a los filamentos de actina con proteínas de membrana (Mueller et al., 2005; Riento y Ridley, 2003).

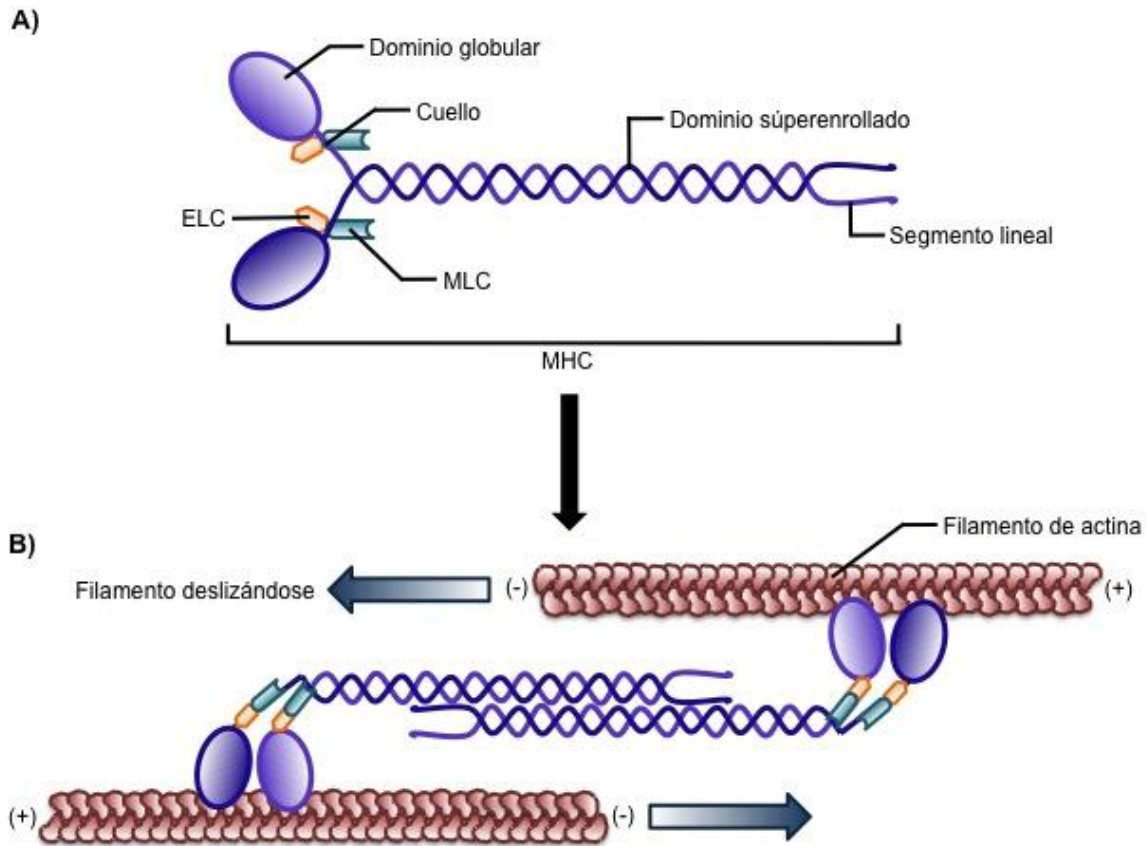
### ***La miosina II***

Las miosinas constituyen una superfamilia de proteínas motoras que producen movimiento a través de la hidrólisis de ATP (Sellers, 2000). Mediante su unión a los filamentos de actina, las miosinas controlan diversos procesos motiles, entre los que se incluyen la citocinesis, la fagocitosis, el mantenimiento y cambio de la morfología celular, la contracción, el transporte vesicular, la exocitosis, la migración, y la adhesión, entre otros (Clark et al., 2007; Landsverk y Epstein, 2005). Con base en análisis filogenéticos, las miosinas se han categorizado en 24 clases, cuya expresión difiere entre las especies (Foth et al., 2006; Sellers, 2000).

En los vertebrados, las principales proteínas contráctiles tanto de células musculares como de células no musculares pertenecen a la clase II. La miosina II, o convencional, existe como una proteína hexamérica, constituida por dos cadenas pesadas (MHCs) de  $\approx 200$  kDa, y dos pares diferentes de cadenas ligeras (Figura 2A). A su vez, cada cadena pesada se subdivide en 3 dominios: 1) un dominio globular N-terminal o cabeza, que se une a la actina y tiene actividad de ATPasa; 2) un cuello, formado por una región  $\alpha$ -hélice a la que se unen las cadenas ligeras, y que funciona como una palanca que permite el movimiento; y 3) una larga secuencia helicoidal en el dominio C-terminal que se homodimeriza para formar una estructura súperenrollada, o cola, que usualmente termina en un pequeño segmento lineal. Adicionalmente, las cadenas de bajo peso molecular incluyen: un par de cadenas ligeras reguladoras (MLCs) de 20 kDa, las cuales controlan la actividad de ATPasa de la miosina; y dos cadenas ligeras esenciales (ELCs), involucradas en mantener la integridad estructural del dominio motor (Clark et al., 2007; Sellers 2000; Vicente-Manzanares et al., 2009). A diferencia de otras proteínas motoras, las miosinas de clase II se auto-ensamblan mediante interacciones electrostáticas de sus dominios súperenrollados, formando filamentos bipolares. Como se observa en la Figura 2B, los dominios globulares de cada extremo de la molécula bipolar se asocian con filamentos de actina orientados de manera opuesta. Cuando se activa la ATPasa, estos filamentos se deslizan, permitiendo la generación de tensión cortical (Clark et al., 2007; Weiss y Leinwand, 1996).

El análisis por secuenciación de las MHCs ha permitido identificar al menos 13 isoformas de la miosina II, las cuales se clasifican de acuerdo con su expresión tejido-específica en tres subgrupos: a) de músculo estriado (incluye proteínas cardíacas y esqueléticas), b) de músculo liso, y c) citoplasmáticas o no musculares (Weiss y Leinwand, 1996). De manera similar, las distintas MLCs se han clasificado en cuatro categorías, las cuales incluyen: 1) MLC<sub>1F</sub> y MLC<sub>3F</sub> para el músculo esquelético rápido; 2) MLC<sub>1s</sub> para el músculo esquelético lento y para el ventrículo cardíaco; 3) MLC<sub>1emb</sub> para los tejidos embrionarios de músculos estriados; y 4) SM/NM MLC para células de músculo liso y no musculares, respectivamente (Gaylinn et al., 1989; Lenz et al., 1989).

En este estudio analizamos el papel de la miosina II citoplasmática (NM-II), la cual regula eventos de adhesión, migración y división celulares. Aunque estas miosinas se denominan “no musculares”, es importante mencionar que también están presentes en células de este tipo, en donde participan durante el desarrollo y diferenciación del músculo estriado, así como durante el mantenimiento del tono muscular (Clark et al., 2007; Vicente-Manzanares et al., 2009).



**Figura 2. Estructura de la miosina II.** **A)** Representación esquemática de la miosina II. ELC; cadena ligera esencial; MHC; cadena pesada de la miosina; MLC, cadena ligera reguladora de la miosina. **B)** Filamentos contráctiles de actina-miosina. (+) extremo más; (-) extremo menos. Imagen modificada de Clark et al., 2007; Vicente-Manzanares et al., 2009.

### *Mecanismos moleculares que regulan la función de la miosina II no muscular*

En células no musculares y de músculo liso, la interacción de la actina con la NM-II se regula a través de la fosforilación reversible de las cadenas ligeras de la miosina (Conti y Adelstein, 2008; Vicente-Manzanares et al., 2009). La fosforilación del residuo Ser19 de la MLC es suficiente para activar completamente a la NM-II (Lowey y Trybus, 2010). Este evento no solo aumenta la actividad de ATPasa del dominio motor, sino que también promueve la formación de los filamentos (Ikebe, 2008). En su forma desfosforilada, cada molécula de miosina consiste de un monómero plegado, incapaz de unirse a la F-actina o de hidrolizar ATP. La fosforilación de la MLC desestabiliza las interacciones iónicas que mantienen a la miosina en su conformación plegada, permitiendo la activación del dominio motor y el ensamble de los filamentos bipolares (Ikebe, 2008; Vicente-Manzanares et al., 2009). Además del residuo Ser19, se ha observado que la fosforilación



del residuo Thr18 aumenta la actividad de  $Mg^{2+}$ -ATPasa así como la formación de los filamentos; por lo que ambos residuos se consideran como sitios de activación de la NM-II (Ikebe, 2008).

### *Vías de señalamiento que controlan la fosforilación / desfosforilación de la MLC*

#### El papel de las cinasas de proteína

La fosforilación de la MLC en los residuos Ser19, Thr18 o ambos, ocurre a través de una red de cinasas, entre las que se incluyen: la cinasa de la MLC dependiente de  $Ca^{2+}$ -calmodulina (MLCK) (Somlyo y Somlyo, 2003); las cinasas de residuos de serina/treonina ROCK (Riento y Ridley, 2003); la cinasa citrón (Yamashiro et al., 2003); la proteína cinasa de interacción con cierres de leucina (ZIP cinasa) (Niuro e Ikebe, 2001); la cinasa asociada a integrinas (ILK) (Deng et al., 2001); la cinasa de unión a Cdc42 relacionada con la cinasa de la distrofia miotónica (MRCK) (Leung et al., 1998); la proteína cinasa asociada a la muerte (DAPK) (Jin et al., 2001); la cinasa activada por p21 (PAK) (Chew et al., 1998); y la proteína cinasa activada por AMP (AMPK) (Lee et al., 2007).

Señales específicas controlan de manera espacio-temporal la activación de estas cinasas. Por ejemplo, la evidencia indica que la despolarización de la membrana, el estiramiento mecánico, o una variedad de agonistas que estimulan receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) resultan en la contracción del músculo liso debido a un aumento en la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular, la activación de la MLCK, y la subsecuente fosforilación de la MLC (Deng et al., 2001; Kamm y Stull, 2001; Morano, 2003). Otros estudios han demostrado que algunos agonistas inducen una respuesta contráctil aún cuando la concentración de  $Ca^{2+}$  permanece constante, proceso denominado como “sensibilización al  $Ca^{2+}$ ”. Entre los mecanismos intracelulares que median este fenómeno se incluyen la desactivación de la fosfatasa de la MLC, así como la fosforilación de la MLC en los residuos Ser19/Thr18 por cinasas independientes de  $Ca^{2+}$ , como ROCK, ILK y ZIP cinasa (Deng et al., 2001; Huang et al., 2006; Niuro e Ikebe, 2001; Somlyo y Somlyo, 2003).

Numerosos estudios han demostrado la participación de la MLCK y de ROCK en la regulación de varios procesos fisiológicos que requieren de la generación de fuerza mecánica, como la contracción del músculo liso (Morano, 2003); el aumento de la permeabilidad de células endoteliales y epiteliales (Dudek y García, 2001; Harhaj y Antonetti, 2004); la citocinesis (Matsumura, 2005); la migración (Kamm y Stull, 2001; Nakayama et al., 2005); la retracción de neuritas (Gallo, 2004; Hirose et al., 1998); y el cierre de heridas epiteliales (Russo et al., 2005). La contribución de las otras cinasas se conoce en menor grado; sin embargo, reportes recientes indican un papel para la cinasa citrón en la citocinesis (Matsumura, 2005); ILK (Huang et al., 2006), ZIP cinasa (Niuro e Ikebe, 2001), y cinasa semejante a ZIP (MacDonald et al., 2001) durante la sensibilización al  $Ca^{2+}$ ; ILK en la reorganización del citoesqueleto de las plaquetas (Kiss et al., 2002); ZIP cinasa en la migración de fibroblastos (Komatsu e Ikebe, 2004); MRCK durante

la invasión de células tumorales (Wilkinson et al., 2005); y AMPK en el control de la división celular y el establecimiento de la polaridad epitelial (Lee et al., 2007).

#### La fosfatasa de la MLC

El nivel de fosforilación de la MLC también depende de la actividad de la fosfatasa de la MLC (MLCP), una enzima heterotrimérica conformada por una subunidad catalítica de 38 kDa perteneciente a la familia de fosfatasas de proteína de tipo 1 (PP1c); una subunidad reguladora de  $\approx$ 130 kDa cuya función consiste en dirigir a la MLCP hacia los filamentos de miosina (MYPT1); y una subunidad pequeña, de 20 kDa (M20) (Ito et al., 2004; Terrak et al., 2004).

La subunidad MYPT1 contiene varios dominios estructurales y funcionales: en su extremo N-terminal se ubica un sitio de unión para la subunidad PP1c, seguido de una región conformada por siete repeticiones de anquirina a la cual se unen diversas proteínas, incluyendo la miosina fosforilada. En la región central se localizan sitios de fosforilación asociados con la inhibición de la fosfatasa; mientras que al dominio C-terminal se une la subunidad M20, la forma activa de RhoA, fosfolípidos y ácido araquidónico (Hirano et al., 2003; Ito et al., 2004).

Se han propuesto tres mecanismos que resultan en la inactivación de la fosfatasa: i) la fosforilación de la subunidad MYPT1, ii) la unión de la MLCP con proteínas inhibitoras; y iii) la disociación de la estructura heterotrimérica (Hirano et al., 2003; Ito et al., 2004).

i) Fosforilación de la subunidad MYPT1. La inactivación de la MLCP a través de la fosforilación de la subunidad MYPT1 fue observada inicialmente como respuesta a la activación de ROCK (Kimura et al., 1996). Trabajos posteriores determinaron que la fosforilación del residuo Thr695 mediada por ROCK (Feng et al., 1999a), la cinasa semejante a ZIP (MacDonald et al., 2001), ILK (Kiss et al., 2002), la proteína cinasa de la distrofia miotónica (Murányi et al., 2001), y Raf-1 (Broustas et al., 2002); resulta en la inhibición de la actividad catalítica de la MLCP. Adicionalmente, se ha observado que ROCK puede fosforilar a la subunidad MYPT1 en el residuo Thr850 (Feng et al., 1999a). Algunos autores han propuesto que la fosforilación en este segundo sitio también bloquea a la MLCP, ya sea al promover la disociación de la subunidad PP1c (Velasco et al., 2002) o al reducir su actividad catalítica (Murányi et al., 2005).

ii) Unión de la MLCP con proteínas inhibitoras. La primera de estas proteínas fue identificada como un substrato de la proteína cinasa C (PKC), y en consecuencia denominada proteína inhibidora de PP1 potenciada por la PKC de 17 kDa (CPI-17) (Eto et al., 1995; Eto et al., 1997). La fosforilación de la proteína CPI-17 en el residuo Thr38 es suficiente para aumentar su actividad inhibidora alrededor de 1000 veces (Kitazawa et al., 2000). Recientemente, se ha demostrado que

además de la PKC, otras cinasas pueden fosforilar el residuo Thr38 *in vitro*, incluyendo aquellas que desactivan a la MLCP a través de la fosforilación de la subunidad MYPT1 y/o fosforilan directamente a las MLCs, como ROCK (Koyama et al., 2000), ILK (Deng et al., 2002), la cinasa semejante a ZIP (MacDonlad et al., 2001) y PAK (Takizawa et al., 2002).

Con base en la similitud de la secuencia del gen que codifica la proteína CPI-17, se han descrito tres nuevos inhibidores de la MLCP: el inhibidor 1 de la holoenzima fosfatasa (PHI-1) (Eto et al., 1999), el inhibidor de PP1 potenciado por cinasas (KEPI) (Liu et al., 2002), y el inhibidor de la fosfatasa de intestino y cerebro (GBPI) (Liu et al., 2004). Como ocurre con la proteína CPI-17, la fosforilación de PHI-1 en el residuo Thr57 (Eto et al., 1999) o de KEPI en el residuo Thr73 (Erdődi et al., 2003) aumenta su actividad inhibidora hacia la MLCP.

iii) Disociación de la estructura heterotrimérica. Se ha observado que la interacción de la subunidad PP1c con las subunidades reguladoras de la MLCP aumenta su actividad catalítica (Hartshorne, 1998); por lo tanto, la disociación de la holoenzima puede resultar en la inhibición de la fosfatasa (Hirano et al., 2003; Ito et al., 2004). Esta posibilidad fue confirmada mediante estudios en células de músculo liso, en donde la interferencia de la subunidad MYPT1 o M20 resultó en un aumento en la sensibilidad al  $Ca^{2+}$  a través de la inhibición de la MLCP endógena (Zhou et al., 1999a; Zhou et al., 1999b). Por otra parte, la fosforilación del dominio conformado por las repeticiones de anquirina de la subunidad MYPT1 se ha relacionado con la inhibición de la MLCP, ya que dicha fosforilación reduce tanto la unión de la subunidad catalítica como la unión de la MLC (Tóth et al., 2000). Adicionalmente, se ha observado que el ácido araquidónico induce la sensibilización al  $Ca^{2+}$  en células de músculo liso, ya sea al unirse al extremo C-terminal de la subunidad MYPT1, lo cual resulta en la disociación de la subunidad PP1c de la holoenzima (Gailly et al., 1996; Gong et al., 1992); o al activar directamente a ROCK (Araki et al., 2001; Feng et al., 1999b).

#### *Activación de la miosina II no muscular en procesos patológicos*

Diversas líneas de investigación indican que la activación de la NM-II interviene en el establecimiento de numerosos padecimientos, entre los que se incluyen: la hipercontractilidad del músculo liso (Wettschureck y Offermanns, 2002), la interrupción de la barrera formada por células endoteliales y epiteliales (Dudek y Garcia, 2001; Turner et al., 2006), la hipertrofia del miocardio (Kuwahara et al., 1999), los desórdenes neurológicos (Mueller et al., 2005), y el cáncer (Clark et al., 2007; Narumiya et al., 2009).

El desarrollo temprano de inhibidores específicos de ROCK, como el fasudil y el Y-27632, ha permitido investigar la participación de esta cinasa en diversas enfermedades. En este sentido, se

ha demostrado que la inhibición de ROCK disminuye la presión sanguínea en varios modelos de hipertensión (Uehata et al., 1997; Mukai et al., 2001); reduce el vasoespasmo coronario y cerebral (Chrissobolis y Sobey, 2006; Kandabashi et al., 2000); confiere broncoprotección a la reacción asmática (Schaafsma et al., 2006); y suprime la hipertrofia ventricular en respuesta a la endotelina 1 (Kuwahara et al., 1999). En línea con la evidencia anterior, se ha observado que la administración de Y-27632 impide el aumento de permeabilidad de células endoteliales y epiteliales estimuladas con agentes inflamatorios (Birukova et al., 2004; Gavara et al., 2006); reduce la invasividad de varios tipos de células tumorales (Sahai y Marshall, 2003; Wyckoff et al., 2006), y también revierte la transformación oncogénica de células epiteliales mamarias (Paszek et al., 2005). Adicionalmente, se ha propuesto la inhibición de ROCK para el tratamiento de la hipertensión ocular y glaucoma (Ramachandran et al., 2011); así como para el tratamiento de desórdenes neurológicos, como el daño de la médula espinal, la enfermedad de Alzheimer y el dolor neuropático (Mueller et al., 2005).

Aunque se conoce muy poco acerca de los mecanismos moleculares que controlan la fosforilación de la MLC en el EPR, evidencia indirecta indica que la maquinaria contráctil de la célula se activa en condiciones patológicas. Por ejemplo, se ha observado que varios factores solubles alteran la permeabilidad de la barrera hematorretiniana (Abe et al., 2003; Ablonczy y Crosson, 2007; Bailey et al., 2004; Giebel et al., 2005; Miyamoto et al., 2007). Algunos de estos factores, entre los que se incluyen el peróxido de hidrógeno (Bailey et al., 2004), la metaloproteínasa de matriz 9 (Giebel et al., 2005) y el factor de crecimiento placentario 1 (Miyamoto et al., 2007); inducen la formación de fibras de estrés de actina, sugiriendo que la tensión generada por dichas fibras media la ruptura de los contactos célula-célula. Otros estudios han mostrado que el TGF- $\beta$  y el PDGF promueven la contracción de geles de colágena, un modelo *in vitro* de la VRP que simula la fuerza de tracción ocasionada por las células transformadas del EPR (Bando et al., 2006; Miura et al., 2006).

Tomando en cuenta que la interacción de las células del EPR con componentes sanguíneos podría contribuir con el establecimiento de desórdenes fibroproliferativos de la retina, varios estudios se han enfocado en dilucidar cuál es el papel de estos compuestos en el transcurso de la VRP, entre los que destaca la trombina. Como veremos en la siguiente sección, esta proteasa modifica la estructura del citoesqueleto de actina de las células (Sah et al., 2000).

### ***La trombina y los receptores activados por proteasas***

#### ***Estructura de la trombina***

La trombina, una proteasa multifuncional de serina, no sólo desempeña un papel central durante la coagulación sanguínea al inducir la agregación plaquetaria y la conversión de fibrinógeno a

fibrina; sino que también regula varios procesos celulares, como la proliferación, la quimiotaxis, la síntesis y liberación de citocinas, la contracción, etc (Coughlin, 2005).

El zimógeno precursor de la trombina (protrombina) se sintetiza en el hígado, desde donde se secreta al plasma sanguíneo. Cuando ocurre una lesión vascular y se inicia la cascada de coagulación, se forma en las células un complejo denominado protrombinasa, el cual lleva a cabo el corte proteolítico de la protrombina (Goldsack et al., 1998; Tanaka y Levy, 2006). En su conformación activa, la trombina está constituida por dos cadenas polipeptídicas, A (36 residuos de aminoácidos) y B (259 residuos de aminoácidos), unidas mediante un puente disulfuro. La cadena B contiene los dominios funcionales más importantes de la proteasa, los cuales incluyen al sitio catalítico, dos sitios electropositivos (exositios I y II), y un sitio de unión a  $\text{Na}^+$ . Los exositios modulan la interacción de la trombina con diversas moléculas, por ejemplo: al exositio I se unen substratos como el fibrinógeno y los receptores activados por proteasas 1 y 4; así como proteínas inhibitoras derivadas de animales hematófagos (hirudina, rhodniina, ornitorina y triabina). Entretanto, sustancias anticoagulantes como la heparina, la antitrombina y la hemadina se unen al exositio II. Finalmente, se sabe que el  $\text{Na}^+$  regula de manera alostérica la actividad de la trombina. Su unión aumenta la afinidad tanto del sitio catalítico como del exositio I por ligandos pro-coagulantes (Bock et al., 2007; Bode, 2006).

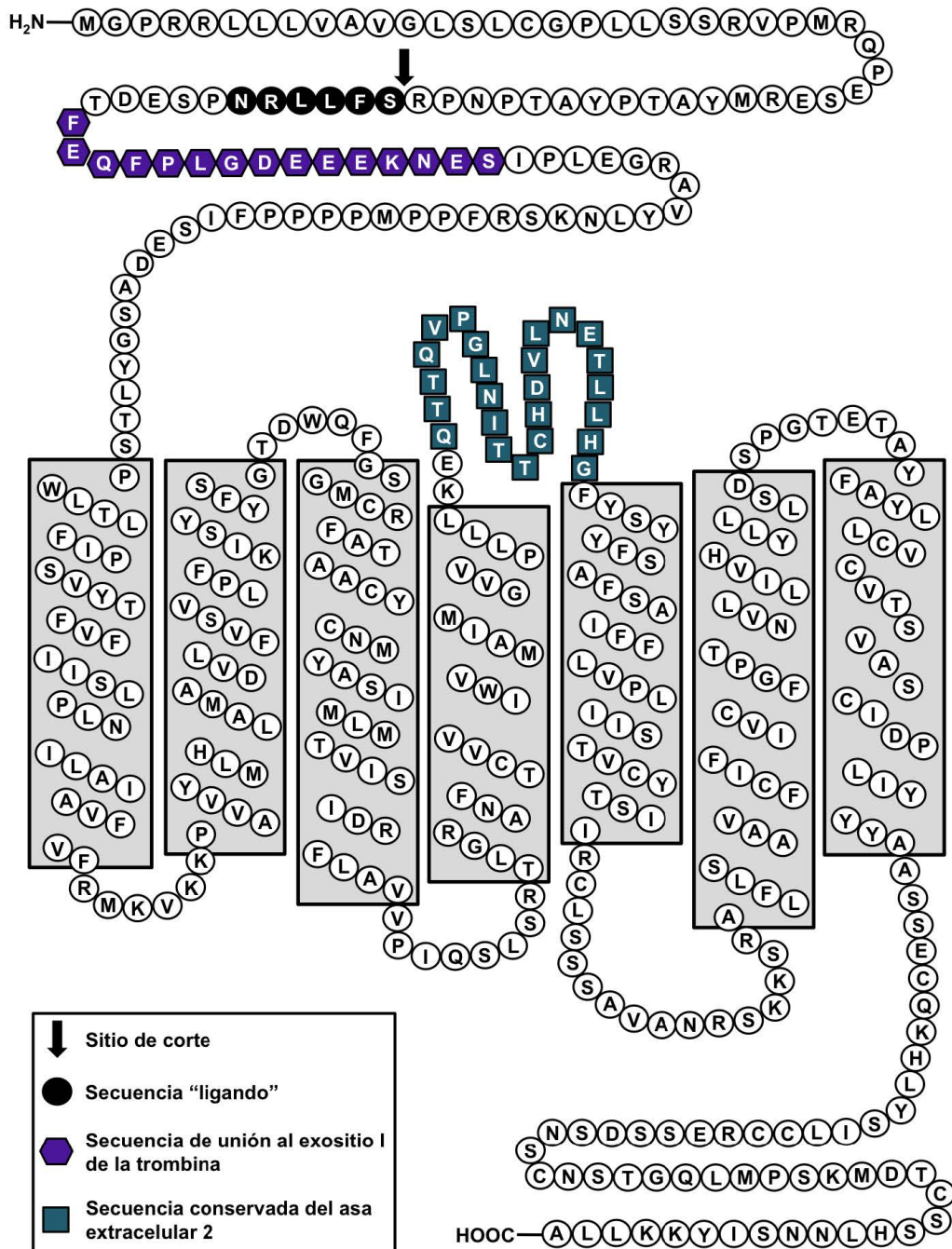
#### *Los receptores activados por proteasas (PARs)*

La trombina ejerce sus efectos en las células a través de receptores activados por proteasas (PARs). Los PARs pertenecen a la familia de receptores con siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G heterotriméricas (Coughlin, 2005; Macfarlane et al., 2001). El mecanismo de activación de los PARs involucra el corte proteolítico de su extremo N-terminal extracelular, lo cual expone una secuencia específica de aminoácidos que, aunque permanece unida al receptor, actúa como ligando para iniciar el señalamiento. Hasta el momento, se han identificado cuatro PARs: PAR-1, -3 y -4, que son activados por la trombina; y PAR-2, que se activa por tripsina, triptasa y otras proteasas de serina (Ramachandran y Hollenberg, 2008). Las características principales de estos receptores se resumen en la Tabla 1 (Hollenberg, 2003; Macfarlane et al., 2001; Noorbakhsh et al., 2003; Ramachandran y Hollenberg, 2008; Soh et al., 2010). Adicionalmente, en la Figura 3 se representa la estructura del receptor PAR-1, el prototipo de esta familia. Es importante notar que la síntesis de distintos péptidos solubles, cuya secuencia corresponde al ligando crítico de cada receptor, ha permitido determinar el funcionamiento particular de los PARs en diversos procesos fisiológicos y patológicos (Ramachandran y Hollenberg, 2008).

Tabla 1. Características de los receptores activados por proteasas (PARs).

	PAR-1	PAR-2	PAR-3	PAR-4
Residuos de aminoácidos	425	397	374	385
Proteasas que regulan la activación	<b>Trombina</b> , tripsina, catepsina G, granzima A, factor VIIa/factor X, plasmina, metaloproteinasa de matriz 1	Tripsina, triptasa, factor VIIa/factor tisular/factor X, proteasa de serina 1 de tipo membranal	<b>Trombina</b> , tripsina*	<b>Trombina</b> , tripsina, catepsina G, factor VIIa/factor X
Sitio del corte y secuencia del ligando	R <sup>41</sup> ↓S <sup>42</sup> FLLRN (h, m, r)	R <sup>36</sup> ↓S <sup>37</sup> LIGKV (h) R <sup>34</sup> ↓S <sup>35</sup> LIGRL (m) R <sup>36</sup> ↓S <sup>37</sup> LIGRL (r)	K <sup>38</sup> ↓T <sup>39</sup> FRGAP (h) K <sup>37</sup> ↓S <sup>38</sup> FNGGP (m)	R <sup>47</sup> ↓G <sup>48</sup> YPGQV (h) R <sup>59</sup> ↓G <sup>60</sup> YPGKF (m) R <sup>58</sup> ↓G <sup>59</sup> FPGKP (r)
Péptido sintético (agonista)	TFLLR-NH <sub>2</sub> (h)	SLGKV-NH <sub>2</sub> (h), SLIGRL-NH <sub>2</sub> (h, m, r), 2F-LIGRL-NH <sub>2</sub> (h, m, r)	TFRGAP (no activa al PAR-3)	GYPGQV-NH <sub>2</sub> (m), AYPGQV-NH <sub>2</sub> (h), GYPGKF-NH <sub>2</sub> (m, r), AYPGKF-NH <sub>2</sub> (m, r)
Proteína G heterotrimérica	G <sub>q</sub> , G <sub>i/0</sub> , G <sub>12/13</sub>	G <sub>q</sub> , G <sub>i/0</sub> , G <sub>12/13</sub>	G <sub>q</sub>	G <sub>q</sub> , G <sub>12/13</sub>
Mecanismo de desensibilización	Fosforilación β-arrestina 1 Internalización Degradación	Fosforilación β-arrestinas 1,2	?	Internalización
Distribución	Plaquetas, células endoteliales, fibroblastos, monocitos, células T, células de músculo liso, células cebadas, osteoblastos, queratinocitos, miocitos; y en el estómago, colon, riñón, testículo, vías respiratorias y cerebro	Células endoteliales, células de músculo liso, células T, neutrófilos, leucocitos, células cebadas, osteoblastos; y en el tracto gastrointestinal, páncreas, hígado, riñón, vías respiratorias, glándulas exócrinas, próstata, ovario, uréter, corazón, piel, ojo y sistema nervioso	Células de músculo liso, plaquetas; y en el corazón, riñón, páncreas, timo, vías respiratorias, intestino, nodos linfáticos, ojo y cerebro	Plaquetas, megacariocitos; y en el intestino, páncreas, testículo, próstata, útero, tiroides, hígado, ojo, cerebro, músculo esquelético, glándula adrenal, colon, nodos linfáticos y pulmón

\*Aunque el corte proteolítico del PAR-3 no inicia el señalamiento en los múridos, se piensa que actúa como cofactor para la activación del PAR-4. H, humano; m, ratón; r, rata; ?, desconocido.



**Figura 3. Estructura del receptor PAR-1.** El modelo se construyó con base en la secuencia del receptor PAR-1 de rata (GenBank: NP\_037082.2). Las hélices transmembranales se definieron con el programa TMHMM (v2.0), y el resultado se comparó con la estructura cristalográfica de la rodopsina (Okada et al., 2001). En la figura se observan los principales dominios funcionales del receptor PAR-1. El "ligando" se une al asa extracelular 2 para iniciar el señalamiento (Macfarlane et al., 2001).

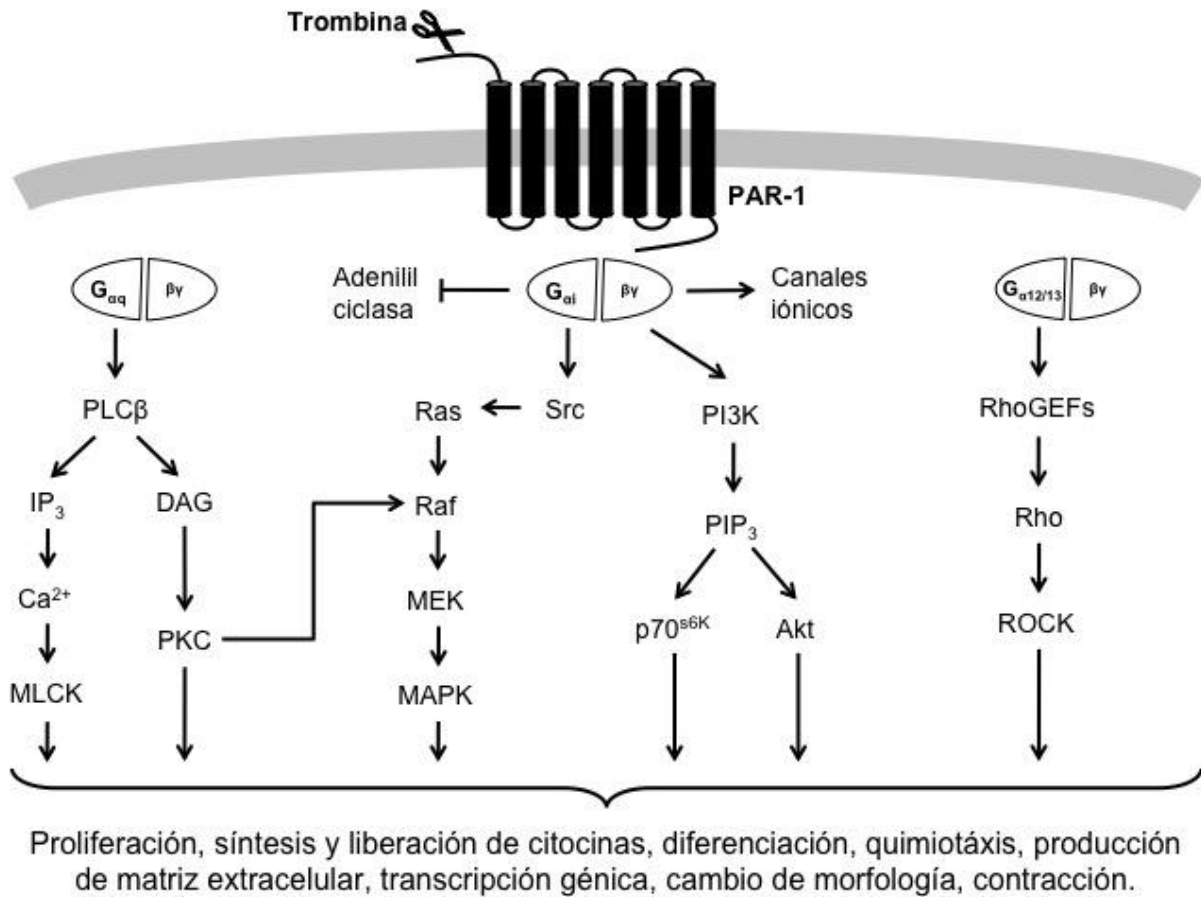
### *Vías de señalamiento activadas por la trombina*

El efecto pleiotrópico de la trombina se debe, principalmente, a la activación del receptor PAR-1, el cual estimula múltiples vías de señalamiento a través de las proteínas G heterotriméricas de tipo  $G_q$ ,  $G_{i/o}$  y  $G_{12/13}$ . A continuación se describen brevemente las vías mejor caracterizadas: por una parte, se sabe que las subunidades  $G_{\alpha q}$  activan a la fosfolipasa  $C\beta$  (PLC $\beta$ ), la cual cataliza la conversión de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato a inositol 1,4,5-trifosfato (IP $_3$ ) y diacilglicerol (DAG). El IP $_3$  aumenta la liberación de  $Ca^{2+}$  del retículo endoplásmico, mientras que el DAG promueve la activación de las isoformas convencionales y nuevas de la PKC. A su vez, esto permite la activación de cinasas y/o fosfatasa dependientes de  $Ca^{2+}$  (como la MLCK), RasGEFs y proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs), entre otros. Las subunidades  $G_{\alpha i}$  inhiben a la adenilil ciclasa, o pueden estimular la cascada de las MAPKs; mientras que las subunidades de tipo  $G_{\beta\gamma}$  median la activación de la fosfatidilinositol 3'-cinasa (PI3K), otras enzimas que modifican lípidos, canales iónicos, y cinasas itinerantes. Finalmente, a través de su interacción con RhoGEFs, las subunidades  $\alpha$  de  $G_{12}$  y de  $G_{13}$  activan la vía de Rho/ROCK (Coughlin, 2005; Macfarlane et al., 2001; Steinhoff et al., 2005). Estudios subsecuentes han demostrado que la estimulación del receptor PAR-1 resulta en la activación de otras moléculas efectoras, como la cinasa Janus (JAK), la cinasa de adhesión focal (FAK), la cinasa N-terminal Jun (JNK), p38, la fosfolipasa  $A_2$  (PLA $_2$ ), y el factor nuclear  $\kappa B$  (NF- $\kappa B$ ) (Macfarlane et al., 2001; Steinhoff et al., 2005).

Como se observa de manera simplificada en la Figura 4, las distintas vías de transducción activadas por la trombina regulan una amplia variedad de procesos biológicos, entre los que se incluyen: la proliferación, la síntesis y liberación de citocinas y de factores de crecimiento, la diferenciación, la producción de matriz extracelular, la contracción, el cambio de morfología, la quimiotaxis, etc (Coughlin, 2005; Macfarlane et al., 2001; Steinhoff et al., 2005).

Particularmente, la trombina promueve la reorganización del citoesqueleto de actina en varios tipos celulares mediante ROCK, la MLCK y la PKC, cuya activación resulta en la formación de fibras contráctiles de actina-miosina y de complejos de adhesión focal a través de la fosforilación de la MLC. Por ejemplo, la activación de la vía de Rho/ROCK, así como la estimulación de la MLCK derivada del aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular, se han relacionado con la actividad contráctil de células endoteliales (Dudek y Garcia, 2001), de células epiteliales (Gavara et al., 2006; Nguyen et al., 2002), de neuronas (Wylie and Chantler, 2003; Yamazaki et al., 2008), de plaquetas (Bodie et al., 2001; Itoh et al., 1992) y de fibroblastos (Emmert et al., 2004; Wadgaonkar et al., 2003) estimulados con trombina y/o péptidos agonistas del receptor PAR-1.





**Figura 4. Principales vías de señalamiento activadas por el receptor PAR-1.** El efecto pleiotrópico de la trombina se debe a la estimulación de múltiples proteínas G heterotriméricas. Akt, proteína cinasa B; DAG, diacilglicerol; IP<sub>3</sub>, inositol 1,4,5-trifosfato; MAPK, proteína cinasa activada por mitógenos; MEK, MAPK cinasa; MLCK, cinasa de la MLC dependiente de Ca<sup>2+</sup>/calmodulina; p70<sup>S6K</sup>, proteína cinasa ribosomal S6 de 70 kDa; PAR-1 receptor activado por proteasas 1; PI3K, fosfatidilinositol 3'-cinasa; PIP<sub>3</sub>, fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato; PKC, proteína cinasa C; PLCβ, fosfolipasa Cβ; RhoGEFs, factores de intercambio de nucleótidos de guanina para la GTPasa Rho; ROCK, cinasas de Rho. Imagen modificada de Coughlin, 2005; Macfarlane et al., 2001; Steinhoff et al., 2005.

#### Participación de la proteína cinasa C (PKC)

La PKC comprende una familia multigénica de cinasas de residuos de serina/treonina que, entre otros procesos, regula la dinámica del citoesqueleto de actina de las células (Larsson, 2006). Los miembros de esta familia contienen un dominio catalítico C-terminal altamente conservado, así como un dominio regulador N-terminal. Este último dominio consiste de una región auto-inhibitoria (pseudosustrato), que mantiene a la enzima en una conformación inactiva, y de dos módulos de unión a la membrana, denominados C1 y C2. De acuerdo con su estructura y mecanismo de activación, las isoformas de la PKC se clasifican en tres subgrupos: convencionales (cPKC: α, βI,

$\beta$ II y  $\gamma$ ), nuevas (nPKC:  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$  y  $\theta$ ) y atípicas (aPKC:  $\zeta$ ,  $\lambda$ 1). Las isoformas convencionales contienen una repetición en tándem del módulo C1, que regula la interacción con el DAG; seguida del dominio C2, el cual se une a fosfolípidos aniónicos de manera dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . La unión de  $\text{Ca}^{2+}$  resulta en la translocación de las cPKCs a la membrana plasmática, en donde la asociación coordinada de ambos módulos con moléculas lipídicas permite la liberación del pseudosustrato del sitio catalítico. Aunque las isoenzimas nuevas también contienen repeticiones en tándem del dominio C1; presentan una variante del módulo C2 que no se puede unir al  $\text{Ca}^{2+}$ . Por lo tanto, la activación de las nPKCs está regulada sólo por la producción de DAG. Las PKC atípicas carecen del dominio C2, y su módulo C1 no se une al DAG, sino a ácidos grasos insaturados como el fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato ( $\text{PIP}_3$ ) y la ceramida. Adicionalmente, contienen un dominio Phox y Bem1 (PB1), el cual regula su interacción con otras proteínas. Tanto la interacción proteína-proteína, como la fosforilación mediada por la cinasa 1 dependiente de fosfoinosítidos (PDK-1), controlan la actividad de las aPKCs (Newton, 2010; Steinberg, 2008). En este contexto, la contracción de actina-miosina inducida por la trombina vía la PKC se ha observado en células endoteliales y plaquetas, en donde la activación de la MLC depende de la fosforilación de GDIs y GEFs para la GTPasa de Rho, lo cual resulta en la activación de RhoA (Holinstat et al., 2003; Knezevic et al., 2007); y de la proteína CPI-17, la cual inhibe a la subunidad catalítica de la MLCP (Watanabe et al., 2001), respectivamente.

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Como se ha mencionado, el EPR constituye un tejido esencial para el mantenimiento de la visión (Simó et al., 2010; Strauss, 2005). La mayoría de las funciones realizadas por el EPR requieren de la organización dinámica del citoesqueleto de actina-miosina, el cual regula procesos motores como la citocinesis, el transporte de componentes citoplasmáticos, la adhesión a otras células y substratos, la fagocitosis y la migración, entre otros (Burnside y Bost-Usinger, 1998). Particularmente, la generación de fuerza mecánica dentro de la célula depende de la fosforilación de la MLC, la cual induce el ensamble y la contracción de los filamentos de actina-miosina (Clark et al., 2007). Debido al papel central de la NM-II en el control de la motilidad celular, en los últimos años se ha incrementado el interés en estudiar los mecanismos que inducen la fosforilación de la MLC durante el establecimiento de condiciones patológicas (Kamm y Stull, 2001). Aunque la contracción de los filamentos de actina-miosina se ha relacionado con una gran variedad de padecimientos, se conoce muy poco acerca de los mecanismos intracelulares que regulan la fosforilación de la MLC en el EPR, como respuesta a estímulos fisiológicos o patológicos. Evidencia indirecta sugiere la participación de la NM-II en procesos que involucran la alteración del EPR, como la interrupción de la barrera hematorretiniana (Bailey et al., 2004; Giebel et al., 2005; Miyamoto et al., 2007; Sakamoto et al., 1994), y la contracción de geles de colágena, un modelo *in vitro* de la VRP (Ando et al., 2000; Bando et al., 2006; Raymond y Thompson, 1990). Con respecto a la evaluación directa de la MLC, Miura et al. (2006) demostró que el TGF- $\beta$ 2 induce la fosforilación de la MLC y la actividad contráctil de células del EPR a través del señalamiento de Rho/ROCK, por lo que esta vía se ha propuesto como un blanco terapéutico para el tratamiento de enfermedades fibroproliferativas de la retina.

Varios autores han resaltado la ruptura de la barrera hematorretiniana, ocasionada por traumas, alteraciones metabólicas o procedimientos quirúrgicos en la retina, como uno de los agentes clave en el desarrollo de varios padecimientos oculares, como la neovascularización subretinal, la retinopatía diabética y la VRP (Pastor et al., 2002; Sakamoto et al., 1994). En estas condiciones, las células del EPR entran en contacto con factores de crecimiento y otros mediadores inflamatorios contenidos en el suero sanguíneo, los cuales promueven la proliferación, transformación y migración de dichas células (Campochiaro et al., 1997; Nagasaki et al., 1998; Saika et al., 2008). Uno de estos factores es la trombina, cuyo señalamiento se asocia tanto con la reparación de tejidos, como con la patogénesis de desórdenes inflamatorios y fibroproliferativos (Ando et al., 2007; Goldsack et al., 1998; Steinhoff et al., 2005; Yoshida et al., 2001). Específicamente, estudios recientes en el EPR han demostrado que la trombina está involucrada en la inducción de procesos característicos de los trastornos fibróticos, entre los que se cuentan:

la expresión de factores de crecimiento, citocinas y quimiocinas (Bian et al., 2007; Hollborn et al., 2009; Palma-Nicolas et al., 2010; Yoshida et al., 2001;), la proliferación (Palma-Nicolas et al., 2008; Parrales et al., 2010), la migración (Palma-Nicolas et al., 2010), y la formación de gaps intercelulares mediada por la reorganización del citoesqueleto de actina (Sakamoto et al., 1994). A pesar de su importancia en el control de procesos motores, los cuales subyacen a la contracción y migración de las células observadas en distintos padecimientos, las vías de transducción activadas por la trombina que inducen un aumento en la fosforilación de la MLC en el EPR no han sido definidas. La identificación y caracterización de estas vías proporcionaría información valiosa para el desarrollo de nuevas terapias para el tratamiento o la prevención de diferentes enfermedades retinianas.

### **3. HIPÓTESIS**

En células del EPR de rata, las vías de transducción de señales activadas por la trombina a través de la proteólisis de los PARs inducen la fosforilación de la MLC, evento que promueve cambios en la estructura del citoesqueleto de actina.

### **4. OBJETIVO GENERAL**

Investigar la intervención de la trombina en la transformación fenotípica de las células del EPR, y su posible contribución al establecimiento de la VRP a través de la activación de los PARs y las vías de señalamiento acopladas a los mismos, cuya estimulación controla la fosforilación de la MLC y la formación de fibras de estrés de actina.

#### ***Objetivos particulares***

1. Determinar si la trombina induce un aumento en la fosforilación de la MLC en células del EPR de rata en cultivo.
2. Identificar el subtipo de receptor involucrado en la fosforilación de la MLC inducida por trombina mediante el uso de péptidos agonistas específicos para cada PAR.
3. Evaluar la participación de las vías de señalamiento conformadas por Rho/ROCK, CaM/MLCK y PKC/CPI-17, en el efecto de la trombina, para lo cual se contempla:
  - Determinar si la trombina activa a la GTPasa RhoA.

-Bloquear farmacológicamente los componentes clave de las vías de señalamiento mencionadas, entre los que se incluyen a ROCK, a la MLCK, a la PLC $\beta$ , a la PI3K y a las diferentes isoformas de la PKC; y determinar su participación en la fosforilación de la MLC.

-Analizar si la trombina induce la inactivación de la MLCP a través de la fosforilación de la subunidad MYPT1 mediada por ROCK, y/o de la activación de la proteína CPI-17 mediante las diferentes isoformas de la PKC.

4. Examinar si la trombina induce la formación de fibras de estrés de estrés de actina en células de EPR de rata en cultivo, y dilucidar las vías de señalamiento involucradas en este proceso mediante el uso de inhibidores farmacológicos.

## 5. METODOLOGÍA

### **Reactivos**

Los reactivos utilizados se adquirieron de las siguientes compañías: los péptidos agonistas para los receptores PAR-3 (H-SFNGGP-NH<sub>2</sub>) y PAR-4 (H-GYPGKF-NH<sub>2</sub>) de Bachem (Torrance, CA); el péptido agonista del receptor PAR-1 (H-SFLLRNPNDKYEPF-OH), la trombina, la hirudina, el Ro-32-0432, el pseudosustrado inhibidor de la PKC $\zeta$  (Myr-SIYRRGARRWRKL), el Y-27632, el ML-7, la rottlerina y el péptido inhibidor de la translocación de la PKC $\epsilon$  (EAVSLKPT) de Calbiochem (San Diego, CA); los anticuerpos para detectar a la MLC fosforilada (Thr18/Ser19), a la MLC, a la subunidad MYPT1 fosforilada (Ser668) y a la subunidad MYPT1 de Cell Signaling (Beverly, MA); el kit G-LISA™ para determinar la activación de RhoA de Cytoskeleton, Inc. (Denver, CO); el medio de montaje para fluorescencia de Dako North America, Inc. (Carpinteria, CA); la albúmina de suero bovino (BSA) de Equitech-Bio Inc. (Kerrville, TX); el medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), la tripsina-EDTA y el suero fetal bovino (FBS) de Gibco BRL (Grand Island, NY); el medio Opti-MEM de Invitrogen (Carlsband, CA); la rodamina acoplada a faloidina de Molecular Probes (Eugene, OR); el péptido inhibidor de las PKC convencionales (Myr-RFARKGALRQKNV) de Promega (Madison, WI); los anticuerpos para detectar a la proteína CPI-17 fosforilada (Thr38) y a la CPI-17 (F-4) de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA); la dispasa, la wortmanina y el forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO); el péptido antagonista específico de la PKC $\delta$  ( $\delta$ V1-1) acoplado a un acarreador TAT mediante un enlace cisteína-cisteína (CYGRKKRRQRRR-OH)-(CSFNSYELGSL-OH) de The American Peptide Company (Sunnyvale, CA); y el U73122, el LY294002 y el PP2 de Tocris (Ellisville, MO).

### **Cultivo primario de EPR de rata**

Para realizar el cultivo se siguió un método descrito previamente (Pacheco-Domínguez et al., 2008). Brevemente: se extrajo el globo ocular de ratas Long Evans de 8-10 días de edad previamente anestesiadas con cloroformo. Los ojos se incubaron por 30 minutos a 37°C con 2% de dispasa en DMEM suplementado con antibióticos (1% de penicilina-estreptomicina-neomicina), 100  $\mu$ g/mL). Para detener la acción de la dispasa el globo ocular se lavó dos veces con DMEM suplementado con antibióticos. Después de retirar el tejido adyacente al globo ocular, éste se cortó por la parte media. La córnea, el cristalino y el vítreo se descartaron; mientras que la parte posterior del ojo se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente en HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, libre de Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>) para permitir al EPR separarse de la retina neural. Al finalizar este periodo, se removió la retina y se aisló el tejido epitelial. Este último se recuperó por centrifugación (5 minutos a 83 g) y fue resuspendido en HBSS con 0.1% de tripsina. El EPR se

incubó por 5 minutos a 37°C, y para finalizar la acción de la tripsina se agregó un exceso de medio Opti-MEM con 4% de FBS. Después de centrifugar el tejido durante 5 minutos a 83 g, se eliminó el sobrenadante, y las células fueron resuspendidas en el medio de crecimiento Opti-MEM con 4% de FBS suplementado con antibióticos (1% de penicilina-estreptomicina-neomicina). La suspensión celular se filtró a través de una malla de nylon de 50 µm de poro, y las células disociadas se sembraron a una densidad de  $2 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> en portaobjetos con 8 pozos (Nalge Nunc International, Rochester, NY) para los ensayos de inmunofluorescencia, y a una densidad de  $3 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> en cajas de cultivo con 6 pozos o en cajas de cultivo de 35 mm x 10 mm (Corning, Inc., Corning, NY) para la inmunodetección con anticuerpos y el ensayo de activación de RhoA, respectivamente. Las células permanecieron hasta su uso en un ambiente humidificado de aire al 95% y CO<sub>2</sub> al 5%, a 37°C. La pureza del cultivo (99.1%) se determinó mediante inmunofluorescencia para la proteína RPE65 (Parrales et al., 2010), y la viabilidad celular (>90%) se estableció mediante exclusión de azul de tripano.

### ***Protocolos de estimulación o inhibición farmacológica***

Todos los experimentos se realizaron en cultivos confluentes de EPR de rata. 24 horas antes de comenzar con el tratamiento correspondiente, el medio de crecimiento se reemplazó por Opti-MEM libre de suero, para evitar la intervención de los diversos factores de crecimiento y citocinas contenidas en éste. Para los ensayos de cinética de activación, las células se estimularon con trombina (2 U/mL), los péptidos agonistas de los PARs (25 µM) o el PMA (1 µM) durante el periodo de tiempo indicado (a menos que se especifique de otra manera). Para los ensayos de inhibición farmacológica, los diferentes compuestos se añadieron al medio 30 minutos antes de la estimulación con trombina o PMA. Se examinó la viabilidad celular mediante azul de tripano para descartar un efecto tóxico de dichos inhibidores.

### ***Inhibición específica de la PKCδ y de la PKCε***

Para determinar el papel de la PKCδ y de la PKCε en el efecto inducido por la trombina, se utilizaron los péptidos inhibidores de la translocación δV1-1 y εV1-2, respectivamente; los cuales corresponden a la región de unión a los receptores para la cinasa C activada (RACK), que es específica de cada isoenzima (Chen et al., 2001). Para introducir los péptidos, las células del EPR se permeabilizaron durante 15 minutos con saponina (50 µg/mL) a 37°C. Después de retirar el detergente, las células se incubaron por 30 minutos con los péptidos δV1-1-TAT (2 µM) o εV1-2 (50-200 µg/mL) antes de la estimulación con trombina (2 U/mL) por 2 minutos.

### ***Inmunodetección con anticuerpos (Western Blot)***

Al finalizar cada tratamiento, las células se recolectaron en buffer de lisis (Tris-HCl 50 mM a pH 7.4, NaCl 150 mM, EDTA 10 mM, SDS al 0.1%, Tritón X-100 al 1%, CHAPS al 1%, NP40 al 0.5% y BSA al 0.1%) suplementado con inhibidores de proteasas (10%) y fosfatasas ( $C_3H_7Na_2O_6P \cdot H_2O$  40 mM y  $Na_4O_7P_2 \cdot 10H_2O$  10 mM). Las muestras se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12.5% o al 7%, seguida de la electrotransferencia de las proteínas a membranas de difluoruro polivinildieno (Millipore, Billerica, MA). Para evitar el pegado inespecífico de los anticuerpos, las membranas se incubaron con 5% de leche en TTBS (Tween<sup>20</sup>-Tris Buffered Saline: Tween<sup>20</sup> al 0.1%, Tris-HCl 20 mM a pH 7.5, NaCl 500 mM) por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas se incubaron toda la noche a 4°C con los siguientes anticuerpos primarios:  $\alpha$ -fosfo-MLC (1:5000),  $\alpha$ -MLC (1:7500),  $\alpha$ -fosfo-MYPT1 (1:1000),  $\alpha$ -MYPT1 (1:1000),  $\alpha$ -fosfo-CPI-17 (1:2000) o  $\alpha$ -CPI-17 (1:1000). Finalizado este periodo, las membranas se lavaron 5 veces por 5 minutos con TTBS, y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente acoplado a peroxidasa de rábano. Después de realizar 7 lavados con TTBS (5 lavados de 5 minutos y 2 lavados de 10 minutos), se reveló con un substrato quimioluminiscente (Millipore, Billerica, MA). La señal se visualizó mediante placas de rayos X Kodak®, y se obtuvieron imágenes digitales utilizando el sistema Alpha Digi-Doc (Alpha-Innotech, San Leandro, CA). La densidad de las bandas se cuantificó utilizando el programa Quantity One v4.6 de BioRad (Hercules, CA). Para determinar el nivel de fosforilación de la muestra, se calculó el cociente fosfo-MLC / MLC total. El nivel de fosforilación basal de la MLC, correspondiente a células no estimuladas, se estableció como el 100% para los ensayos de curso temporal y de dosis-respuesta. En los ensayos en los que se incluyeron los distintos inhibidores farmacológicos, la fosforilación de la MLC correspondiente a células estimuladas con trombina se estableció como el 100% (control). El mismo criterio se utilizó para cuantificar la fosforilación de la subunidad MYPT1 y de la proteína CPI-17.

### ***Ensayo de activación de RhoA***

La activación de RhoA se determinó con un kit basado en el inmunoensayo unido a una enzima (ELISA), G-LISA™, de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante. Brevemente: después de la estimulación con trombina, las células se lisaron y congelaron en nitrógeno líquido hasta su uso. Para retener la forma activa de RhoA, después de cuantificar y normalizar la cantidad de proteína en cada muestra, se agregaron 1.5 mg/mL de proteína a una caja de cultivo con 96 pozos recubierta con una proteína que une específicamente a Rho-GTP. La caja se incubó durante 30 minutos a 4°C con agitación (200 rpm). Posteriormente, las muestras se lavaron 2 veces y se incubaron por 2 minutos a temperatura ambiente con un buffer de presentación de



antígenos. Después de realizar 3 lavados, las muestras se incubaron con el anticuerpo primario  $\alpha$ -RhoA (1:250) por 45 minutos a temperatura ambiente con agitación (200 rpm). Al término de este periodo se realizaron 3 lavados, y las muestras se incubaron con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano (1:62.5) por 45 minutos a temperatura ambiente con agitación (200 rpm). Se realizaron 3 lavados más, y las muestras se incubaron con un reactivo de detección durante 15 minutos a 37°C. La lectura se realizó a 490 nm en el detector de absorbancia Opsys microplate reader (Dyner Technologies, Chantilly, VA).

### ***Inmunofluorescencia para F-actina***

Para evaluar la reorganización del citoesqueleto de actina, se analizó la formación de fibras de estrés mediante inmunofluorescencia. Después del tratamiento correspondiente, las células se fijaron con 2% de para-formaldehído durante 20 minutos. Las células se lavaron 2 veces con PBS (Phosphate Buffered Saline:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1.9 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8.1 mM, NaCl 154 mM) por 5 minutos, y se permeabilizaron con 0.1% de Tritón X-100 por 5 minutos. Las células se lavaron 4 veces más con PBS (2 lavados de 1 minuto y 2 lavados de 5 minutos), y para evitar la unión inespecífica del anticuerpo, las células se incubaron con buffer de bloqueo (1% de BSA en PBS) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Para teñir a la F-actina, las células se incubaron con rodamina acoplada a faloidina (1:150) por 1 hora a temperatura ambiente y en la oscuridad. Antes de montar la preparación con el medio Dako, se realizaron 3 lavados finales con PBS por 5 minutos. Las preparaciones se observaron y fotografiaron en un microscopio confocal Olympus FluoView FV1000 (Olympus Corporation, Tokio, Japón) a una magnificación de 40X. El tiempo de exposición y la intensidad del láser se ajustaron para obtener una visualización óptima de la muestra. Dichos parámetros se mantuvieron constantes para todos los experimentos. La fluorescencia relativa de la F-actina se determinó con el programa Image-Pro Plus (Media Cybernetics, Inc., Bethesda, MD). Para ello, por cada condición se calculó la intensidad de la fluorescencia proveniente de 45 células distribuidas en 3 campos representativos. Los datos se normalizaron al dividir la intensidad de la fluorescencia entre el área total de la célula.

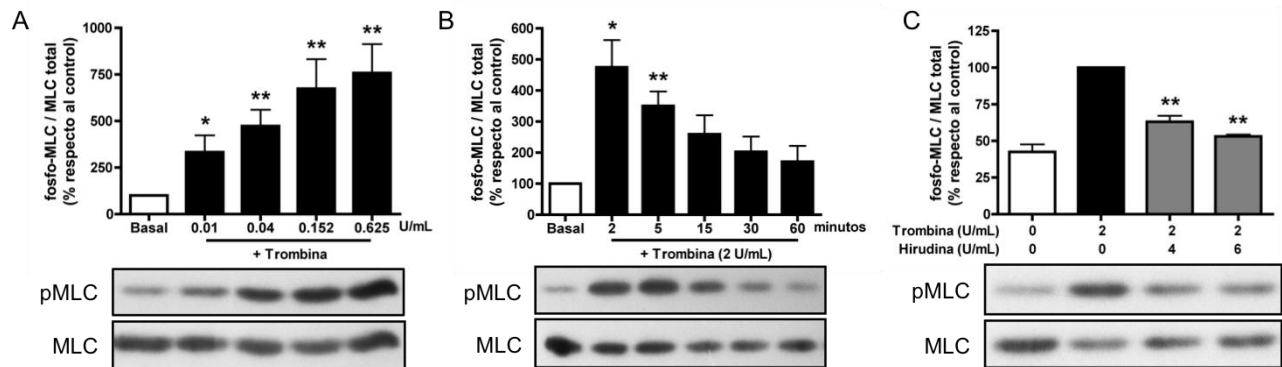
### ***Análisis estadístico***

Los datos utilizados para el análisis estadístico son representativos de 3 experimentos independientes. La significancia se determinó con el programa GraphPad Prism V4.0 (Graph Pad Software, Inc., La Jolla, CA), mediante una prueba de t de Student no pareada (valor de P: dos colas, intervalo de confianza: 95%): \* si  $p < 0.05$ , \*\* si  $p < 0.01$ , \*\*\* si  $p < 0.001$ .

## 6. RESULTADOS

### **Efecto de la trombina sobre la fosforilación de la MLC**

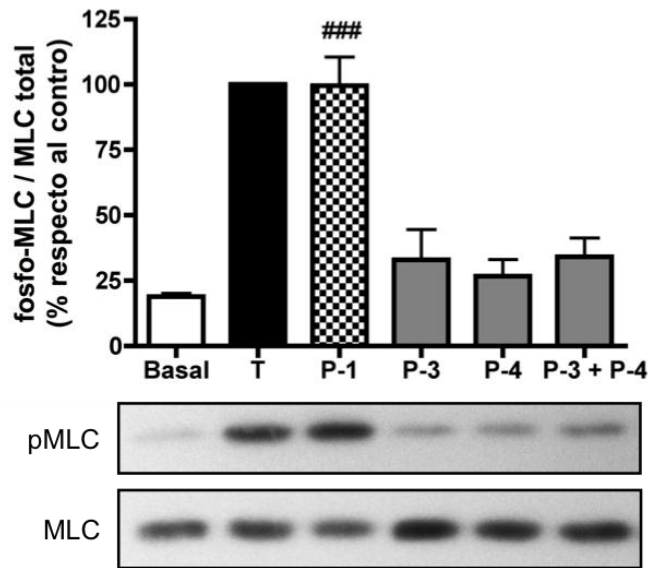
Dado que la contracción de actina-miosina se inicia con la fosforilación de la MLC (Clark et al., 2007; Sah et al., 2000), primero se estudió el efecto de la trombina sobre la fosforilación de esta proteína en células del EPR de rata en cultivo. Como se muestra en la Figura 5A, la trombina indujo un aumento significativo en la fosforilación de la MLC de manera dependiente de la dosis. Este efecto se impidió al co-incubar a la trombina con su inhibidor específico, la hirudina (Figura 5C). En la curva temporal se observa que la fosforilación máxima se alcanzó rápidamente, a los 2 minutos, declinando gradualmente en los minutos subsiguientes (Figura 5B).



**Figura 5. La trombina induce la fosforilación de la MLC en células del EPR de rata.** Las células del EPR se privaron de suero durante 24 horas previas a su estimulación con trombina por 2 minutos. Los extractos totales se inmunodetectaron utilizando anticuerpos  $\alpha$ -fosfo-MLC o  $\alpha$ -MLC. **A)** La trombina induce la fosforilación de la MLC de manera dependiente de la dosis. **B)** Curso temporal de la fosforilación de la MLC inducida por trombina. Los valores de las células sin estimular se establecieron como el 100%. **C)** La inhibición de la trombina con hirudina impide la fosforilación de la MLC. La trombina y la hirudina se co-incubaron durante 30 minutos a 37°C antes del tratamiento. Los valores de la células estimuladas con trombina se establecieron como el 100%. Los resultados representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar de 3 experimentos independientes. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , prueba de t de Student.

El señalamiento intracelular mediado por la trombina se activa mediante los receptores PAR-1, -3 y -4 (Coughlin, 2005). Además, un estudio reciente reportó la expresión de los receptores PAR-1 y PAR-3 en células del EPR de rata en cultivo (Parrales et al., 2010). Para identificar el subtipo de receptor involucrado en la fosforilación de la MLC inducida por trombina, las células del EPR se estimularon con distintos péptidos agonistas correspondientes a cada PAR. Los resultados mostraron que sólo el péptido agonista del receptor PAR-1 indujo una respuesta equivalente a la

de la trombina (Figura 6). En contraste, los péptidos agonistas de los receptores PAR-3 y/o PAR-4, no modificaron el nivel basal de fosforilación de la MLC.



**Figura 6. La trombina induce la fosforilación de la MLC a través del receptor PAR-1.** Las células del EPR se privaron de suero durante 24 horas, y posteriormente se estimularon por 2 minutos con trombina (2 U/mL) o con los péptidos agonistas de los PARs (25  $\mu$ M). Los extractos totales fueron inmunodetectados utilizando anticuerpos  $\alpha$ -fosfo-MLC o  $\alpha$ -MLC. Los valores de las células estimuladas con trombina se establecieron como el 100%. Los resultados representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar de 3 experimentos independientes. ### $p$ <0.001 (basal versus P-1), prueba de t de Student. T, trombina; P-1, péptido agonista del receptor PAR-1; P-3, péptido agonista del receptor PAR-1; P-4, péptido agonista del receptor PAR-4.

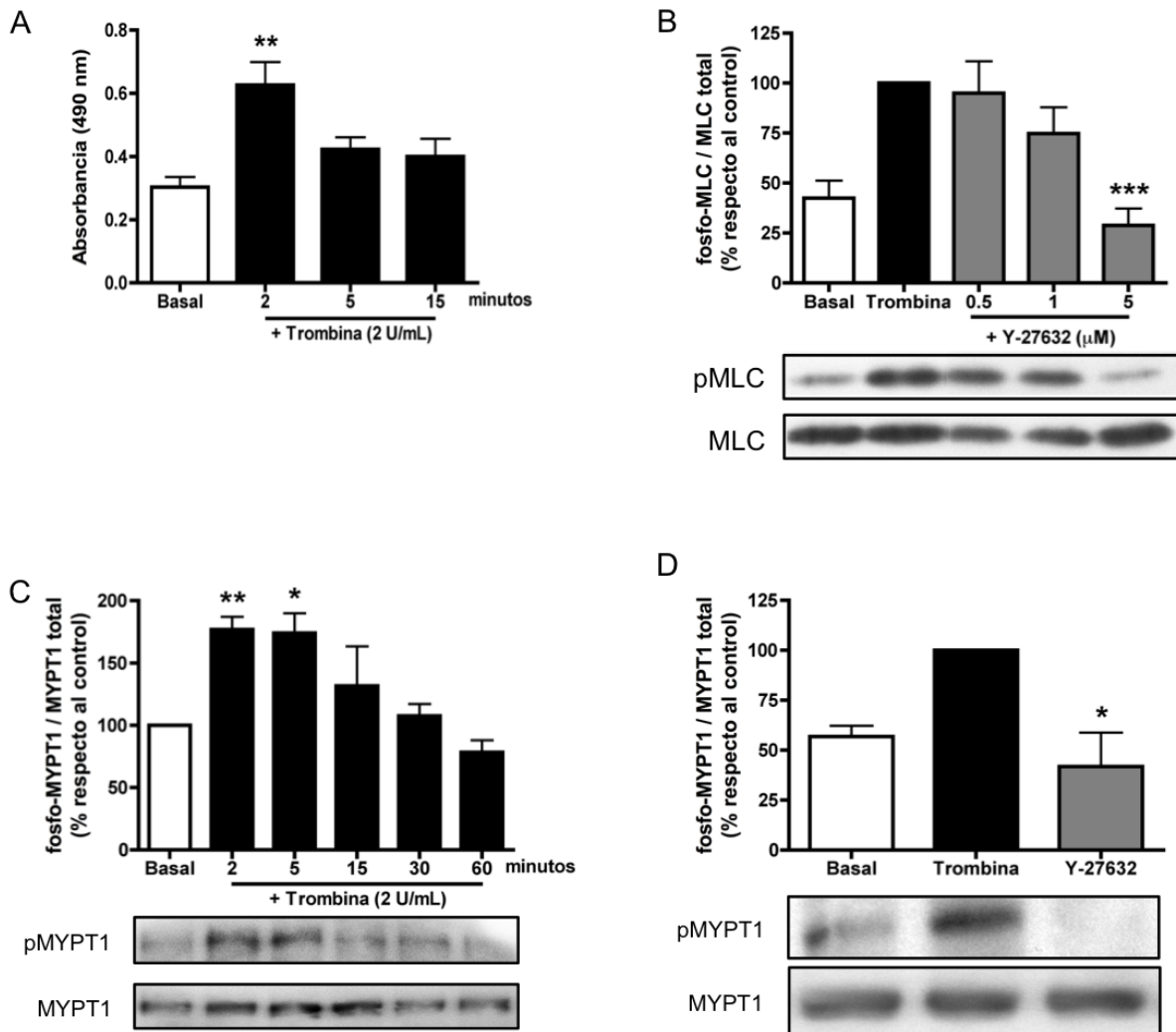
### ***Vías de señalamiento que controlan la fosforilación de la MLC inducida por trombina***

#### ***Participación de la vía Rho/Rho-cinasa (ROCK)***

Se sabe que la estimulación de los GPCRs acoplados a las proteínas  $G_{12/13}$  y  $G_q$  resultan en la activación de la GTPasa Rho (Sah et al., 2000). Para explorar esta posibilidad, se determinó la cantidad de RhoA-GTP en células del EPR de rata mediante el kit G-LISA™. En la Figura 7A se observa un aumento significativo en la activación de esta GTPasa a los 2 minutos de estimulación con trombina, seguida de su rápida desactivación. La cinética de activación de RhoA mostró una correlación precisa con el curso temporal establecido para la fosforilación de la MLC, lo que sugiere que estos dos procesos están directamente relacionados.

Una de las principales proteínas efectoras de Rho es ROCK, la cual regula el nivel de fosfo-MLC al catalizar la propia fosforilación de la MLC, o al desactivar a la MLCP (Hirano et al., 2003). Para determinar el papel de ROCK en la fosforilación de la MLC inducida por trombina, las células del

EPR se pre-incubaron con el fármaco Y-27632, un conocido inhibidor de esta enzima (Mueller et al., 2005). En la Figura 7B se observa que el Y-27632 impidió la fosforilación de la MLC inducida por trombina de manera dependiente de la dosis. Asimismo, se probó el efecto de la trombina sobre la fosforilación de la subunidad MYPT1, lo cual resulta en la inhibición de la MLCP (Ito et al., 2004). De acuerdo con los resultados previos, la trombina indujo la fosforilación de la subunidad MYPT1 alcanzando su máximo nivel a los 2 minutos de estimulación (Figura 7C). Asimismo, la inhibición de ROCK con el Y-27632 impidió completamente la fosforilación de la subunidad MYPT1 inducida por la trombina (Figura 7D). En conjunto, estos resultados demostraron que la trombina induce la fosforilación de la MLC a través de una vía dependiente de RhoA/ROCK/MYPT1 en células del EPR de rata.

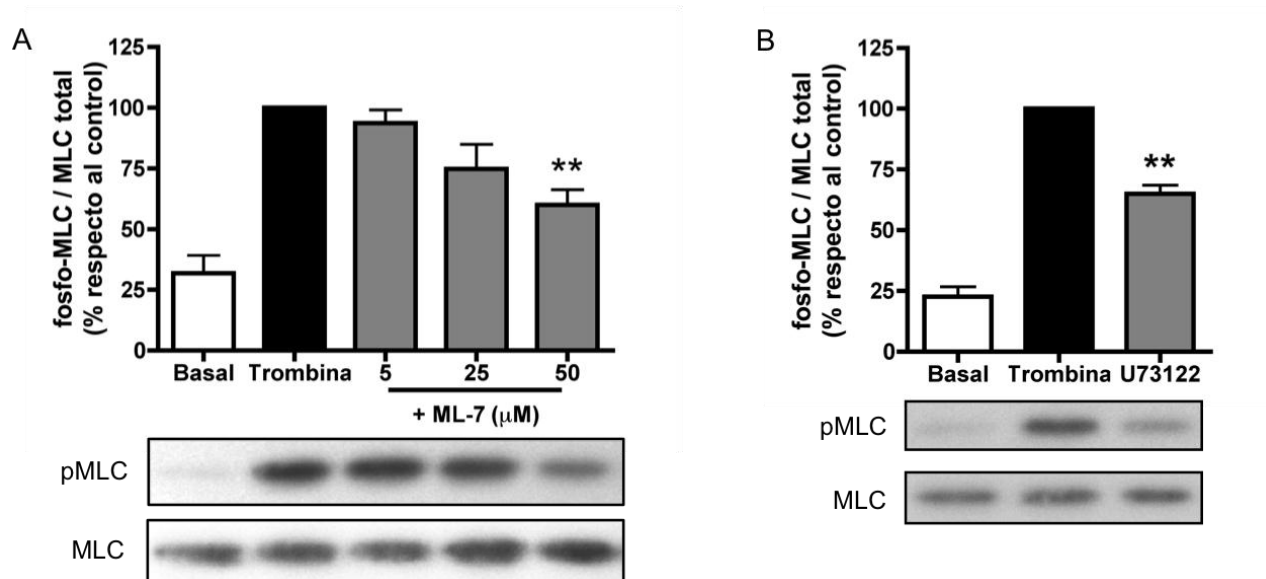


**Figura 7. La vía de Rho/ROCK media la fosforilación de la MLC inducida por trombina.** Las células del EPR se privaron de suero durante 24 horas previas a la estimulación con trombina (2 U/mL). **A)** Cinética de activación de RhoA, cuantificada mediante G-LISA™. **B)** ROCK regula la fosforilación de la MLC inducida por trombina. Las células se incubaron por 30 minutos con dosis crecientes de Y-27632, un conocido inhibidor de ROCK, antes del tratamiento con trombina por 2 minutos. Los extractos totales fueron inmunodetectados utilizando anticuerpos  $\alpha$ -fosfo-MLC o  $\alpha$ -MLC. Los valores de las células estimuladas con trombina se establecieron como el 100%. **C)** La trombina induce la inhibición de la MLCP mediante la fosforilación de la subunidad MYPT1. Los extractos totales fueron inmunodetectados utilizando anticuerpos  $\alpha$ -fosfo-MYPT1 o  $\alpha$ -MYPT1. Los valores de las células sin estimular se establecieron como el 100%. **D)** La inhibición de ROCK impide la fosforilación de la subunidad MYPT1. Las células se incubaron con Y-27632 (5  $\mu$ M) por 30 minutos, seguidos de la estimulación con trombina durante 2 minutos. Los extractos totales fueron inmunodetectados utilizando anticuerpos  $\alpha$ -fosfo-MYPT1 o  $\alpha$ -MYPT1. Los valores de las células estimuladas con trombina se establecieron como el 100%. Los resultados representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar de 3 experimentos independientes. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , prueba de t de Student.

#### *Activación de la cinasa de la MLC dependiente de $Ca^{2+}$ /calmodulina (MLCK)*

Otra de las enzimas que regulan la fosforilación de la MLC es la MLCK, cuya activación depende de  $Ca^{2+}$ /calmodulina (CaM) (Somlyo y Somlyo, 2003). Se evaluó la posible contribución de esta cinasa al efecto de la trombina mediante el uso de su inhibidor farmacológico, el compuesto ML-7 (Saitoh et al., 1987). Los resultados mostraron que la fosforilación de la MLC inducida por trombina se redujó  $\approx 50\%$  en células del EPR pre-incubadas con el ML-7 (Figura 8A).

Se sabe que la activación del receptor PAR-1 resulta en la estimulación de la PLC $\beta$  y en el aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular (Coughlin, 2005), lo cual puede promover la activación de la MLCK. Para examinar esta posibilidad, las células del EPR se pre-incubaron con el inhibidor de la PLC $\beta$ , el fármaco U73122. En la Figura 8B se observa que el tratamiento con el U73122 impidió la fosforilación de la MLC al mismo nivel que el ML-7. Estos resultados sugieren que la estimulación de la PLC $\beta$  mediada por la trombina contribuye a la fosforilación de la MLC a través de la liberación intracelular de  $Ca^{2+}$ , que posteriormente activa a la MLCK.



**Figura 8. Participación de la MLCK en la fosforilación de la MLC inducida por trombina en células del EPR de rata.** Las células se privaron de suero 24 horas antes de su estimulación con trombina. **A)** Inhibición dosis-dependiente de la MLCK. Las células se incubaron con dosis crecientes del inhibidor específico de la MLCK, el fármaco ML-7, durante 30 minutos previos al tratamiento con trombina (2 U/mL) por 2 minutos. **B)** Participación de la PLC $\beta$  en el efecto de la trombina. Las células se incubaron por 30 minutos con el inhibidor de la PLC $\beta$ , el compuesto U73122 (3  $\mu$ M), antes de la estimulación con trombina (2 U/mL por 2 minutos). Los extractos totales fueron inmunodetectados utilizando anticuerpos  $\alpha$ -fosfo-MLC o  $\alpha$ -MLC. Los valores de las células estimuladas con trombina se establecieron como el 100%. Los resultados representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar de 3 experimentos independientes. \*\* $p < 0.01$ , prueba de t de Student.

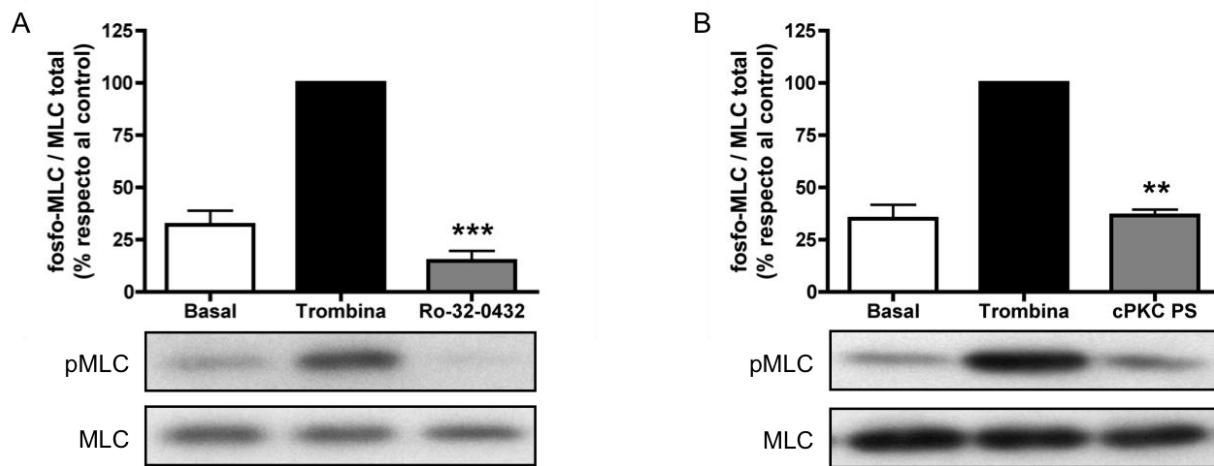
### *El papel de las isoformas de la PKC*

Estudios previos han demostrado que el efecto de la trombina sobre la proliferación y la migración de las células del EPR requiere del señalamiento mediado por las isoformas convencionales y atípicas de la PKC (Palma-Nicolas et al., 2010; Parrales et al., 2010). Además, la participación de la PLC $\beta$  en la fosforilación de la MLC inducida por la trombina sugiere a las isoformas de la PKC como posibles mediadoras de dicho efecto. Específicamente, se sabe que en el EPR de rata se expresan las isoformas  $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  y  $\zeta$  de la PKC (Wood y Osborne, 1998); sin embargo, las isoenzimas que regulan la reorganización del citoesqueleto de actina en el EPR se desconocen.

### PKC convencionales y nueva ( $\delta$ )

El primer paso para analizar la participación de las diferentes isoformas de la PKC en la fosforilación de la MLC inducida por la trombina consistió en pre-incubar a las células del EPR con

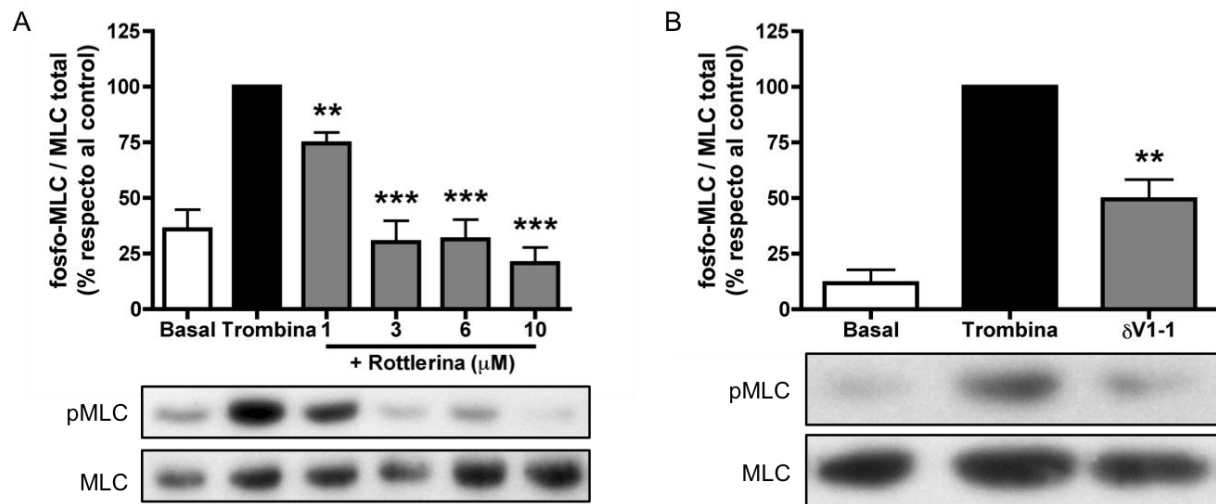
la bisindolilmaleimida Ro-32-0432, que se sabe inhibe a las isoformas convencionales y nueva ( $\epsilon$ ) de la PKC (Wilkinson et al., 1993). La Figura 9A muestra que el Ro-32-0432 impidió completamente el aumento en la fosforilación de la MLC inducida por la trombina. Para corroborar la participación de las cPKC en la fosforilación de la MLC, se utilizó un péptido miristoilado que contiene la región del pseudosustrato de la PKC $\alpha$  y la PKC $\beta$  (cPKC PS). Como se observa en la Figura 9B, la pre-incubación de las células del EPR con el cPKC PS impidió la fosforilación de la MLC en respuesta a la trombina. Estos resultados demostraron que la fosforilación de la MLC inducida por trombina requiere de la actividad de las isoformas convencionales (probablemente  $\alpha$  y/o  $\beta$ ) de la PKC.



**Figura 9. Las PKC convencionales median la fosforilación de la MLC inducida por trombina.** Las células del EPR se privaron de suero durante 24 horas, y posteriormente se incubaron por 30 minutos con los siguientes inhibidores antes del tratamiento con trombina (2 U/mL por 2 minutos): **A)** Ro-32-0432 (10  $\mu$ M) para las isoformas convencionales y nueva ( $\epsilon$ ) de la PKC, y **B)** un péptido pseudosustrato miristoilado para las isoenzimas convencionales de la PKC (cPKC PS, 50  $\mu$ M). Los extractos totales fueron inmunodetectados utilizando anticuerpos  $\alpha$ -fosfo-MLC o  $\alpha$ -MLC. Los valores de las células estimuladas con trombina se establecieron como el 100%. Los resultados representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar de 3 experimentos independientes. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , prueba de t de Student.

La participación de la PKC $\delta$  en la fosforilación de la MLC inducida por factores de crecimiento (Iwabu et al., 2004), así como en la reorganización y contracción del citoesqueleto de actina, ha sido propuesta en diferentes tipos celulares (Massoumi et al., 2002; Poole y Furness, 2007). Para determinar el papel de las isoformas nuevas  $\epsilon$  y  $\delta$  de la PKC en la fosforilación de la MLC inducida por trombina en el EPR, se examinó el efecto de distintos inhibidores farmacológicos para cada isoenzima. Los resultados mostraron que la inhibición de la PKC $\delta$  con rottlerin ( $IC_{50} \approx 3-6 \mu$ M;

Gschwendt et al., 1994) impidió la fosforilación de la MLC inducida por trombina de manera dependiente de la dosis (Figura 10A), mientras que la inhibición de la PKC $\epsilon$  con un péptido inhibidor de la translocación no tuvo efecto (datos no mostrados). Para descartar un efecto inespecífico de la rottlerina (Soltoff, 2007), se inhibió el señalamiento de la PKC $\delta$  mediante un péptido antagonista específico ( $\delta$ V1-1) (Chen et al., 2001). De acuerdo con el resultado anterior, la inhibición de la PKC $\delta$  con su péptido antagonista impidió la fosforilación de la MLC inducida por trombina (Figura 10B).



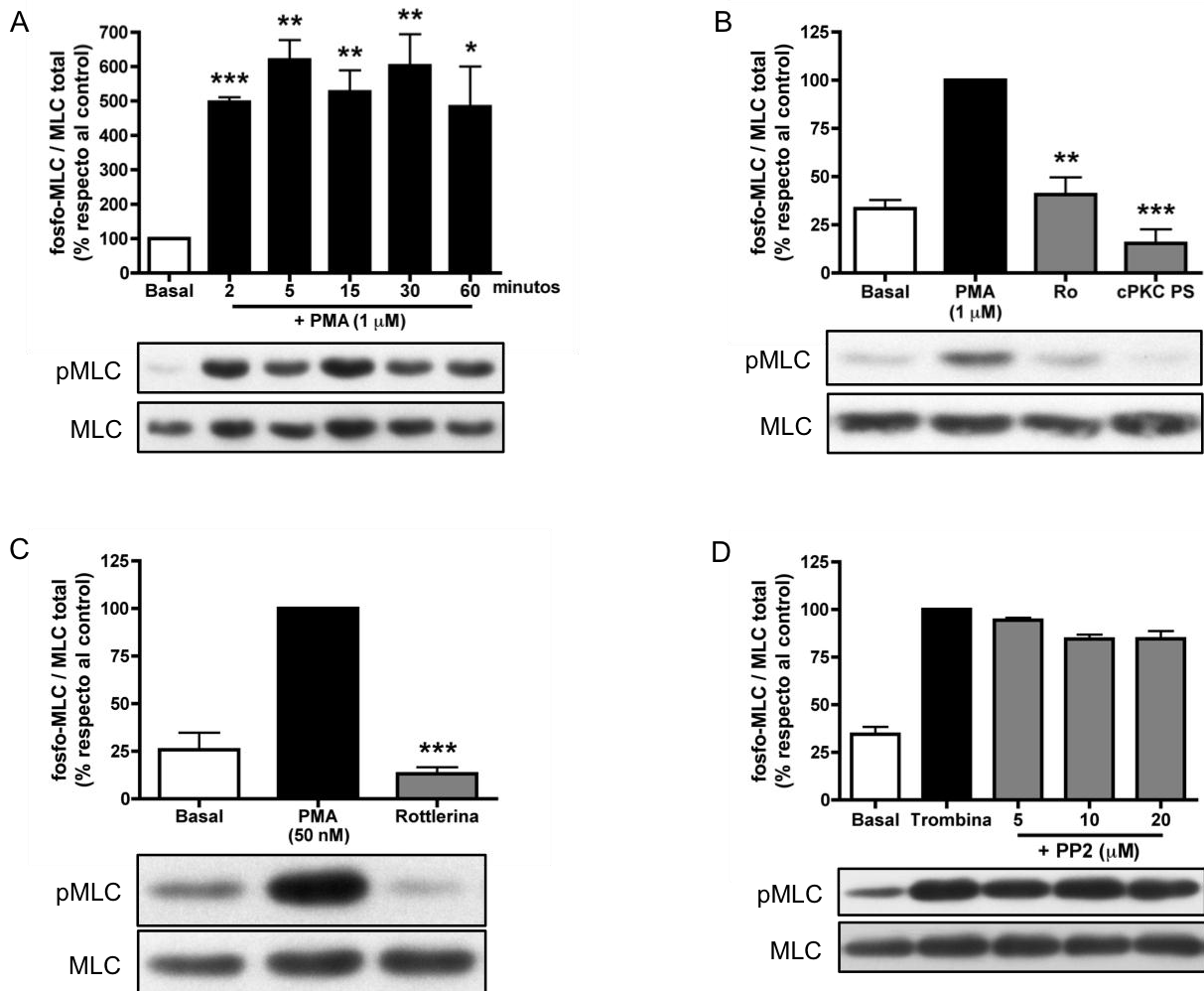
**Figura 10. La inhibición de la PKC $\delta$  impide la fosforilación de la MLC inducida por trombina.** Las células del EPR se privaron de suero durante 24 horas. **A)** Efecto de la rottlerina en la fosforilación de la MLC inducida por trombina. Las células se incubaron con dosis crecientes de rottlerina, inhibidor de la PKC $\delta$ , por 30 minutos previos a la estimulación con trombina (2 U/mL durante 2 minutos). **B)** La inhibición específica de la PKC $\delta$  impide la fosforilación de la MLC inducida por trombina. Las células se permeabilizaron con saponina (50  $\mu$ g/mL), y después se incubaron por 30 minutos con el péptido inhibidor de la translocación de la PKC $\delta$  ( $\delta$ V1-1, 2  $\mu$ M) antes del tratamiento con trombina (2 U/mL durante 2 minutos). Los extractos totales fueron inmunodetectados utilizando anticuerpos  $\alpha$ -fosfo-MLC o  $\alpha$ -MLC. Los valores de las células estimuladas con trombina se establecieron como el 100%. Los resultados representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar de 3 experimentos independientes. \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001, prueba de t de Student.

Para confirmar la participación de las isoformas convencionales y nuevas de la PKC en la fosforilación de la MLC inducida por trombina, se probó el efecto del forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), un análogo del DAG que activa de manera irreversible a dichas isoformas (Riento y Ridley, 2003). Los resultados demostraron que el tratamiento con 1  $\mu$ M de PMA indujo la fosforilación sostenida de la MLC (Figura 11A), efecto que se impidió al pre-incubar a las células con los



inhibidores de las cPKC: Ro-32-0432 y el cPKC PS (Figura 11B). Dado que el dominio C1 de las isoformas nuevas de la PKC tiene una mayor afinidad por el DAG (Newton, 2010), se utilizaron 50 nM de PMA para determinar la contribución de la PKC $\delta$  en el efecto de este forbol. Como se observa en la Figura 11C, la estimulación con 50 nM de PMA indujo un aumento significativo en la fosforilación de la MLC, el cual se impidió al inhibir a la PKC $\delta$  con rottlerina.

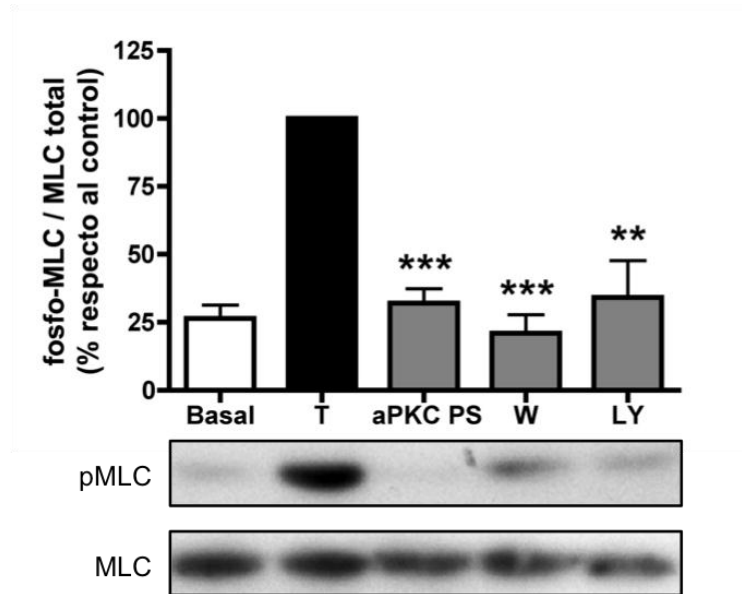
Recientemente se han descrito dos mecanismos de activación para la PKC $\delta$ : uno que depende de la formación de DAG en la membrana plasmática, Golgi y mitocondria; y otro en el núcleo que requiere de la fosforilación mediada por Src (Kajimoto et al., 2010). Para identificar el posible mecanismo de activación de la PKC $\delta$ , las células del EPR se pre-incubaron con el inhibidor específico de Src, el fármaco PP2. En la Figura 11D se observa que la inhibición de Src no tuvo efecto sobre la fosforilación de la MLC inducida por trombina, lo cual sugiere que la activación de la PKC $\delta$  inducida por esta proteasa está mediada por la producción de DAG en la membrana plasmática. En conjunto, estos datos indican que las isoformas clásicas y nueva ( $\delta$ ) de la PKC participan en la fosforilación de la MLC inducida por trombina.



**Figura 11. La fosforilación de la MLC depende de la activación de las isoformas de la PKC sensibles al DAG. A)** El PMA induce la fosforilación sostenida de la MLC. Las células del EPR se privaron de suero durante 24 horas previas a la estimulación con PMA (1  $\mu$ M) durante el periodo de tiempo indicado. Los extractos totales fueron inmunodetectados utilizando anticuerpos  $\alpha$ -fosfo-MLC o  $\alpha$ -MLC. Los valores de las células sin estimular se establecieron como el 100%. **B)** Las isoformas convencionales de la PKC median la fosforilación de la MLC inducida por el PMA. Células privadas de suero se incubaron con los inhibidores de las cPKC por 30 minutos antes de la estimulación con PMA (1  $\mu$ M durante 2 minutos): Ro-32-0432 (10  $\mu$ M) y cPKC PS (50  $\mu$ M). **C)** Participación de la PKC $\delta$  en el efecto del PMA. Células privadas de suero se incubaron con el inhibidor de la PKC $\delta$ , la rottlerina (10  $\mu$ M), durante 30 minutos previos al tratamiento con PMA (50 nM por 2 minutos). Los extractos totales fueron inmunodetectados utilizando anticuerpos  $\alpha$ -fosfo-MLC o  $\alpha$ -MLC. Los valores de las células estimuladas con PMA se establecieron como el 100%. **D)** La inhibición de Src no impide la fosforilación de la MLC inducida por trombina. Las células privadas de suero se incubaron por 30 minutos con dosis crecientes del inhibidor específico de Src, el fármaco PP2, antes de su estimulación con trombina (2 U/mL durante 2 minutos). Los extractos totales fueron inmunodetectados utilizando anticuerpos  $\alpha$ -fosfo-MLC o  $\alpha$ -MLC. Los valores de las células estimuladas con trombina se establecieron como el 100%. Los resultados representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar de 3 experimentos independientes. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001, prueba de t de Student.

### PKC atípica ( $\zeta$ )

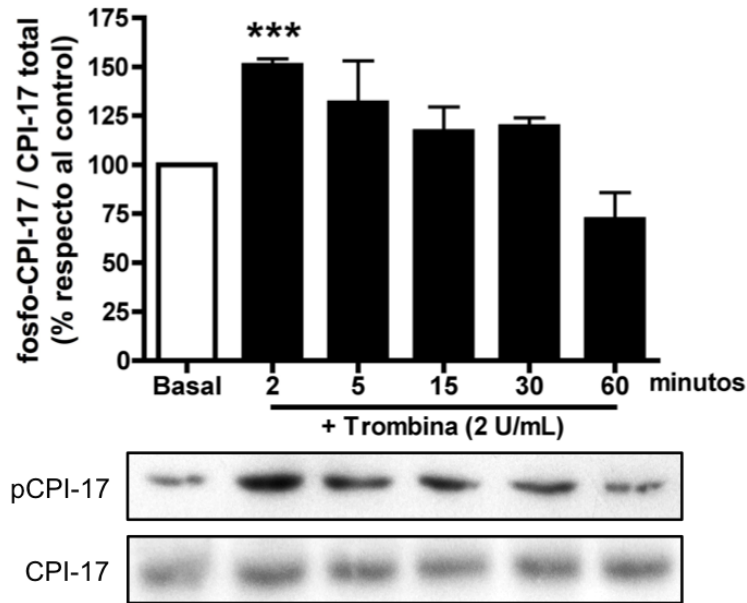
La evidencia indica que las isoformas atípicas de la PKC se activan como respuesta a la trombina en células endoteliales (Li et al., 2004; Minshall et al., 2010) y en el EPR (Palma-Nicolas et al., 2008). Para dilucidar el papel de dicha isoenzima, se bloqueó su activación mediante el uso de un péptido pseudosustrato miristoilado (aPKC PS). Los resultados demostraron que la inhibición de la PKC $\zeta$  impidió completamente la fosforilación de la MLC inducida por trombina (Figura 12). Con base en este resultado, después se inhibió a la PI3K, enzima que media la activación de esta isoforma (Di Liberto et al., 2003). En la Figura 12 se observa que la inhibición farmacológica de la PI3K utilizando wortmannina o LY294002, impidió la fosforilación de la MLC inducida por trombina. Estos resultados indican que la activación de la vía PI3K/PKC $\zeta$ , posiblemente a través de las subunidades  $G_{\beta\gamma}$ , conduce a la fosforilación de la MLC.



**Figura 12. La fosforilación de la MLC inducida por trombina requiere de la activación de la vía de señalamiento PI3K/PKC $\zeta$ .** Las células del EPR se privaron de suero 24 horas, y después se incubaron durante 30 minutos con los siguientes inhibidores antes de la estimulación con trombina (2 U/mL por 2 minutos): aPKC PS (25  $\mu$ M) para la PKC $\zeta$ , y wortmannina (1  $\mu$ M) o LY294002 (50  $\mu$ M) para la PI3K. Los extractos totales fueron inmunodetectados utilizando anticuerpos  $\alpha$ -fosfo-MLC o  $\alpha$ -MLC. Los valores de las células estimuladas con trombina se establecieron como el 100%. Los resultados representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar de 3 experimentos independientes. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , prueba de t de Student.

#### Fosforilación de la proteína CPI-17

Una de las principales moléculas efectoras de la PKC, involucrada en promover la contracción de los filamentos de actina-miosina, es la proteína CPI-17. Varios trabajos han demostrado que esta proteína media la inhibición de la MLCP cuando está fosforilada en el residuo Thr38 (Eto, 2009). Aunque su expresión se ha detectado en células de músculo liso, células endoteliales, plaquetas y neuronas (Eto, 2009), no ha sido identificada en el EPR. Para investigar si la proteína CPI-17 funciona como un intermediario en la fosforilación de la MLC inducida por trombina en células del EPR, primero se probó el efecto de la trombina sobre la fosforilación de dicha proteína. Como se observa en la Figura 13, la trombina indujo un aumento significativo en la fosforilación del residuo Thr38 de la proteína CPI-17 a los 2 minutos de estimulación, lo cual concuerda de manera precisa con el curso temporal de fosforilación de la MLC reportado previamente (Figura 5B).

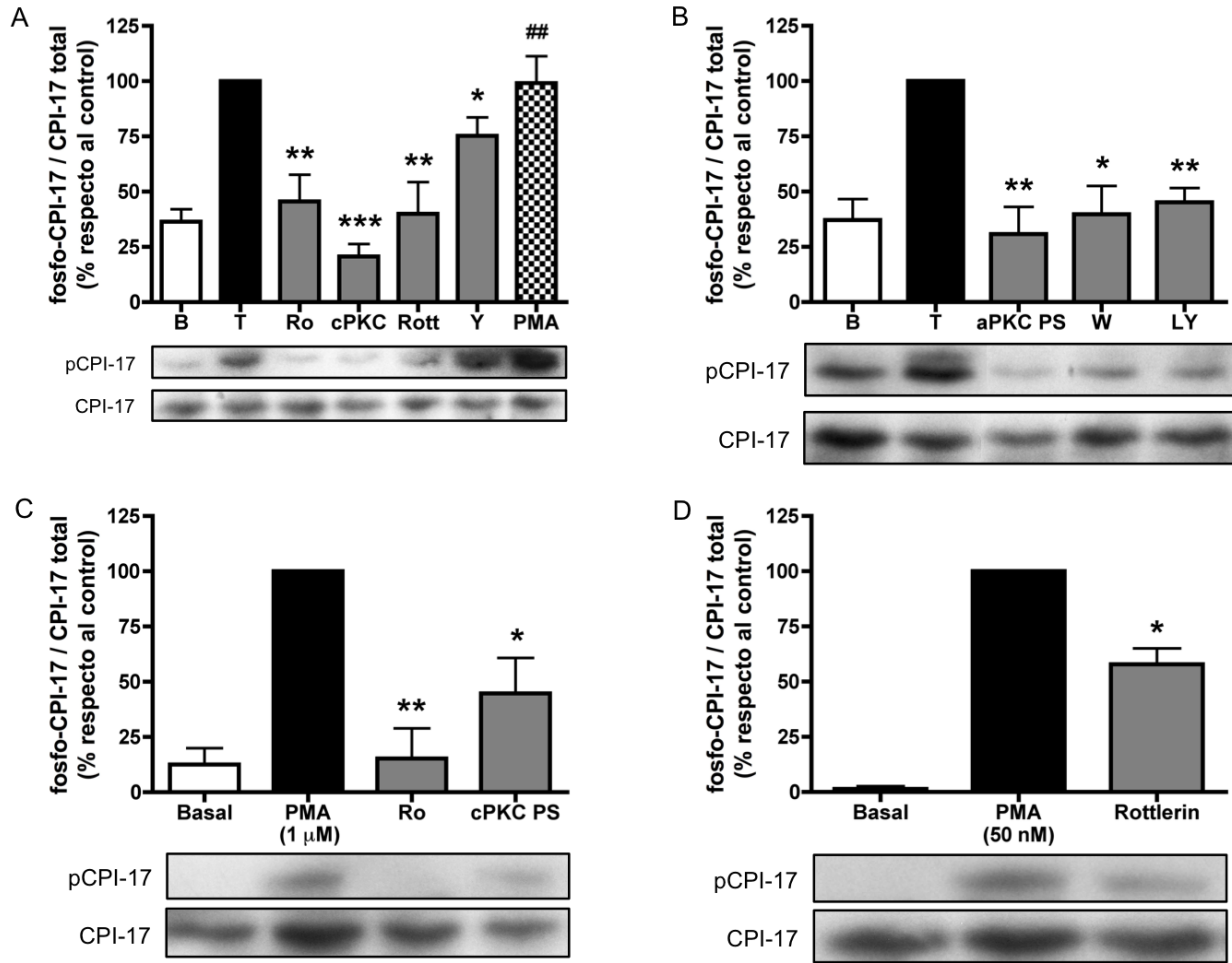


**Figura 13. La trombina induce la fosforilación de la proteína CPI-17 en células del EPR de rata.** Las células se privaron de suero durante 24 horas antes de la estimulación con trombina (2 U/mL) por el periodo de tiempo indicado. Los extractos totales fueron inmunodetectados utilizando anticuerpos  $\alpha$ -fosfo-CPI-17 o  $\alpha$ -CPI-17. Los valores de las células sin estimular se establecieron como el 100%. Los resultados representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar de 3 experimentos independientes. \*\*\* $p < 0.001$ , prueba de t de Student.

Se ha propuesto a la proteína CPI-17 como un sustrato de todas las isoformas de la PKC (Zemlickova et al., 2004). Para identificar las posibles isoenzimas involucradas en la fosforilación de la proteína CPI-17 inducida por trombina, primero se probó el efecto de los distintos inhibidores farmacológicos de las c/n PKC. También se evaluó el efecto del compuesto Y-27632, ya que se ha observado que ROCK puede fosforilar el residuo Thr38 de dicha proteína (Koyama et al., 2000). Como se muestra en la Figura 14A, mientras que la fosforilación de la proteína CPI-17 se abatió completamente cuando se inhibieron las isoformas convencionales y nueva ( $\delta$ ) de la PKC, el bloqueo de ROCK resultó en una disminución de  $\approx 25\%$ , lo cual sugiere que la activación de la proteína CPI-17 está mediada principalmente por miembros de la PKC. De manera consistente con estos resultados, el PMA indujo un aumento significativo en la fosforilación de la proteína CPI-17, efecto que se impidió al inhibir farmacológicamente a las isoformas convencionales (Figura 14C) y  $\delta$  (Figura 14D) de la PKC.

Finalmente, para evaluar la contribución de la vía PI3K/PKC $\zeta$  en el efecto de la trombina, las células del EPR se pre-incubaron con el péptido pseudosustrato de la PKC $\zeta$  (aPKC PS), la

wortmannina y el LY294002. Como se esperaba, la inhibición farmacológica de estas cinasas impidió la fosforilación de la proteína CPI-17 en respuesta a la trombina (Figura 14B).

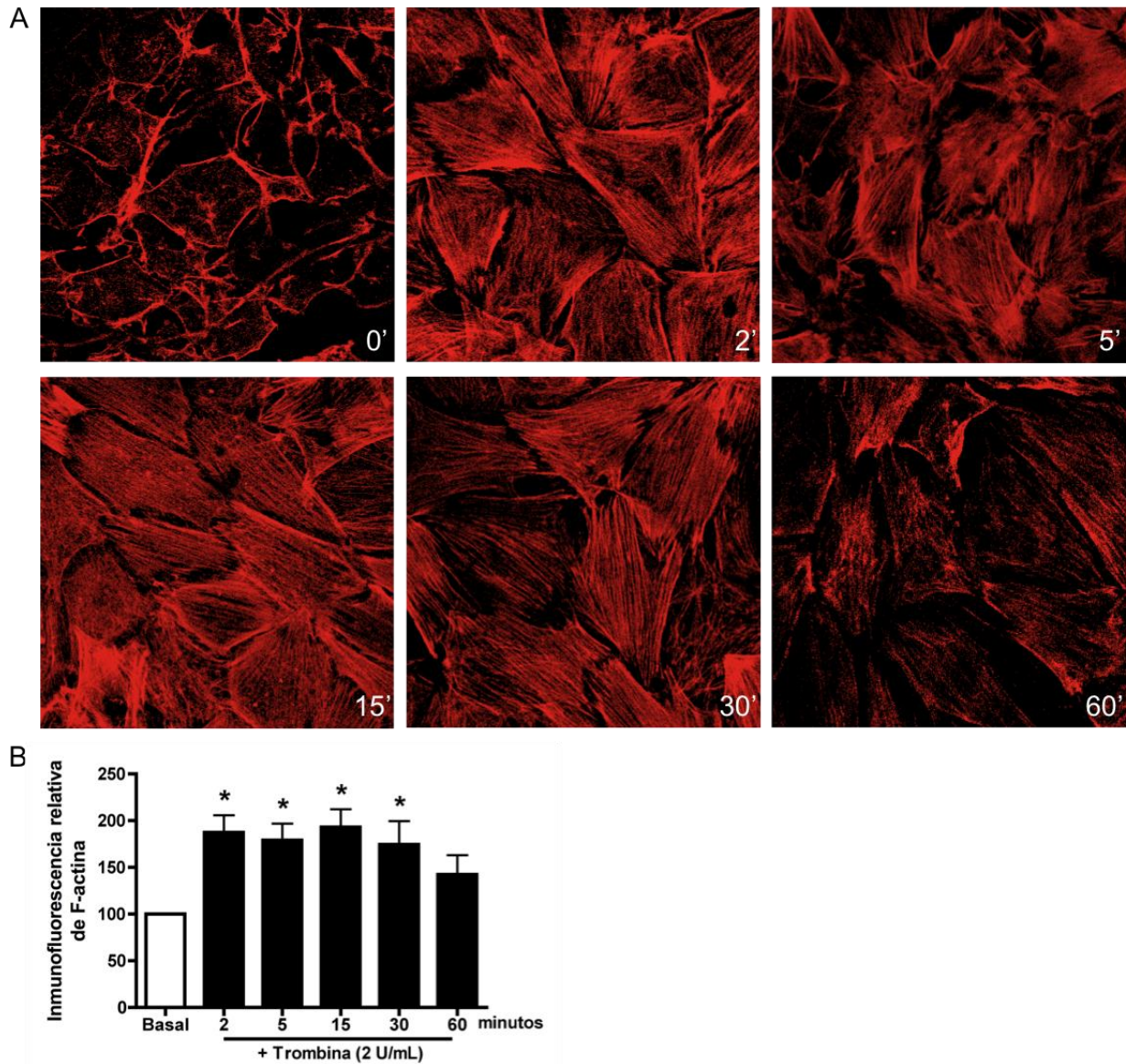


**Figura 14. La familia de la PKC media la fosforilación de la proteína CPI-17 en respuesta a la trombina.** Las células del EPR se privaron de suero durante 24 horas antes de la estimulación con trombina. **A)** Efecto de las isoformas convencionales y nueva ( $\delta$ ) de la PKC en la fosforilación de la proteína CPI-17 inducida por trombina. Las células se incubaron con los siguientes inhibidores por 30 minutos previos al tratamiento con trombina (2 U/mL durante 2 minutos): Ro-32-0432 (10  $\mu$ M) para las isoformas convencionales y nueva ( $\epsilon$ ) de la PKC, cPKC PS (50  $\mu$ M) para las isoformas convencionales de la PKC, rottlerin (10  $\mu$ M) para la PKC $\delta$  y Y-27632 (5  $\mu$ M) para ROCK. El PMA (1  $\mu$ M) tiene un efecto similar al de la trombina, confirmando la participación de las isoformas c/n PKC. **B)** El señalamiento mediado por la vía PI3K/PKC $\zeta$  contribuye a la fosforilación de la proteína CPI-17 inducida por la trombina. Las células del EPR se incubaron con los siguientes inhibidores por 30 minutos antes de la estimulación con trombina (2 U/mL durante 2 minutos): aPKC PS (25  $\mu$ M) para la PKC $\zeta$ , y wortmannina (1  $\mu$ M) o LY294002 (50  $\mu$ M) para la PI3K. Los extractos totales fueron inmunodetectados utilizando anticuerpos  $\alpha$ -fosfo-CPI-17 o  $\alpha$ -CPI-17. Los valores de las células estimuladas con trombina se establecieron como el 100%. **C)** Las isoformas convencionales de la PKC median la fosforilación de la MLC inducida por el PMA. Células privadas de suero

se incubaron con los inhibidores de las cPKC por 30 minutos previos al tratamiento con PMA (1  $\mu$ M durante 2 minutos): Ro-32-0432 (10  $\mu$ M) y cPKC PS (50  $\mu$ M). **D)** Participación de la PKC $\delta$  en el efecto del PMA. Células privadas de suero se incubaron con el inhibidor de la PKC $\delta$ , la rottlerina (10  $\mu$ M), durante 30 minutos antes de la estimulación con PMA (50 nM por 2 minutos). Los extractos totales fueron inmunodetectados utilizando anticuerpos  $\alpha$ -fosfo-CPI-17 o  $\alpha$ -CPI-17. Los valores de las células estimuladas con PMA se establecieron como el 100%. Los resultados representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar de 3 experimentos independientes. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 o ### $p$ <0.01 (basal versus PMA), \*\*\* $p$ <0.001, prueba de t de Student. **A:** B, basal; T, trombina; Ro, Ro-32-0432; cPKC, cPKC PS; Rott, rottlerina; Y, Y-27632. **B:** B, basal; T, trombina; W, wortmannina; LY, LY294002. **C:** Ro, Ro-32-0432.

### ***Efecto de la trombina sobre la formación de fibras de estrés de actina***

Numerosos reportes indican que la trombina induce la reorganización del citoesqueleto de actina en las células a través de la formación de fibras de estrés de actina y de complejos de adhesión focal (Sah et al., 2000). Para evaluar el efecto de la trombina sobre la morfología de las células del EPR, primero se analizó el curso temporal de formación de fibras de estrés de actina mediante inmunofluorescencia. Como se observa en la Figura 15A, en células sin estimular la F-actina se distribuyó de manera cortical y en forma de haces delgados y difusos. En contraste, a los dos minutos de tratamiento la F-actina se reorganizó para formar fibras gruesas que atravesaban a la célula. El análisis cuantitativo de la fluorescencia confirmó un aumento en la formación de fibras de estrés hasta los 60 minutos de estimulación con trombina (Figura 15B).

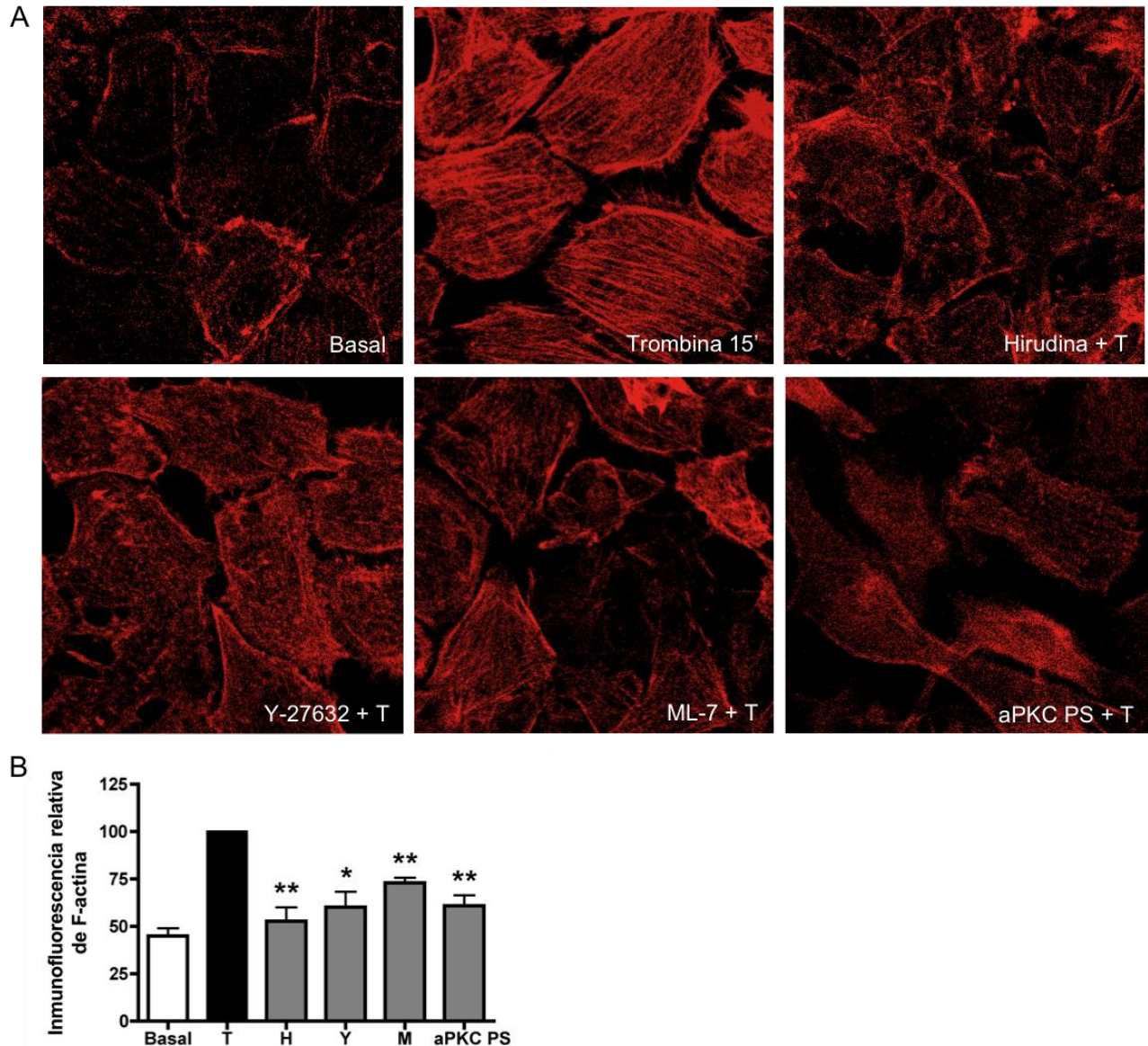


**Figura 15. La trombina induce el ensamble de fibras de estrés de actina en células de EPR de rata. A)** Las células se privaron de suero durante 24 horas previas a la estimulación con trombina (2 U/mL) por el periodo de tiempo indicado. Las células se fijaron y tiñeron con rodamina acoplada a faloidina para visualizar a la F-actina. **B)** Cuantificación de la fluorescencia relativa de F-actina. Los valores de la fluorescencia de las células sin estimular se establecieron como el 100%. Los resultados representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar de 3 experimentos independientes. \* $p < 0.05$ , prueba de t de Student.

La reorganización del citoesqueleto de actina está estrechamente asociada con la activación de la NM-II, la cual depende de la fosforilación de la MLC (Sah et al., 2000). Por lo tanto, en la siguiente serie de experimentos se evaluó la formación de las fibras de estrés de actina inducida por la trombina bajo la presencia de los inhibidores farmacológicos que impiden la fosforilación de la



MLC. Por una parte, como se observa en la Figuras 16 A y B, la inhibición de la trombina con hirudina, así como el bloqueo de ROCK (Y-27632), de la MLCK (ML-7) o de la PKC $\zeta$  (aPKC PS), atenuaron de manera significativa la formación de fibras de estrés en respuesta a la trombina.

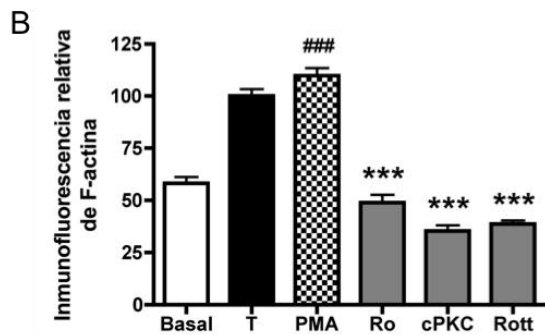
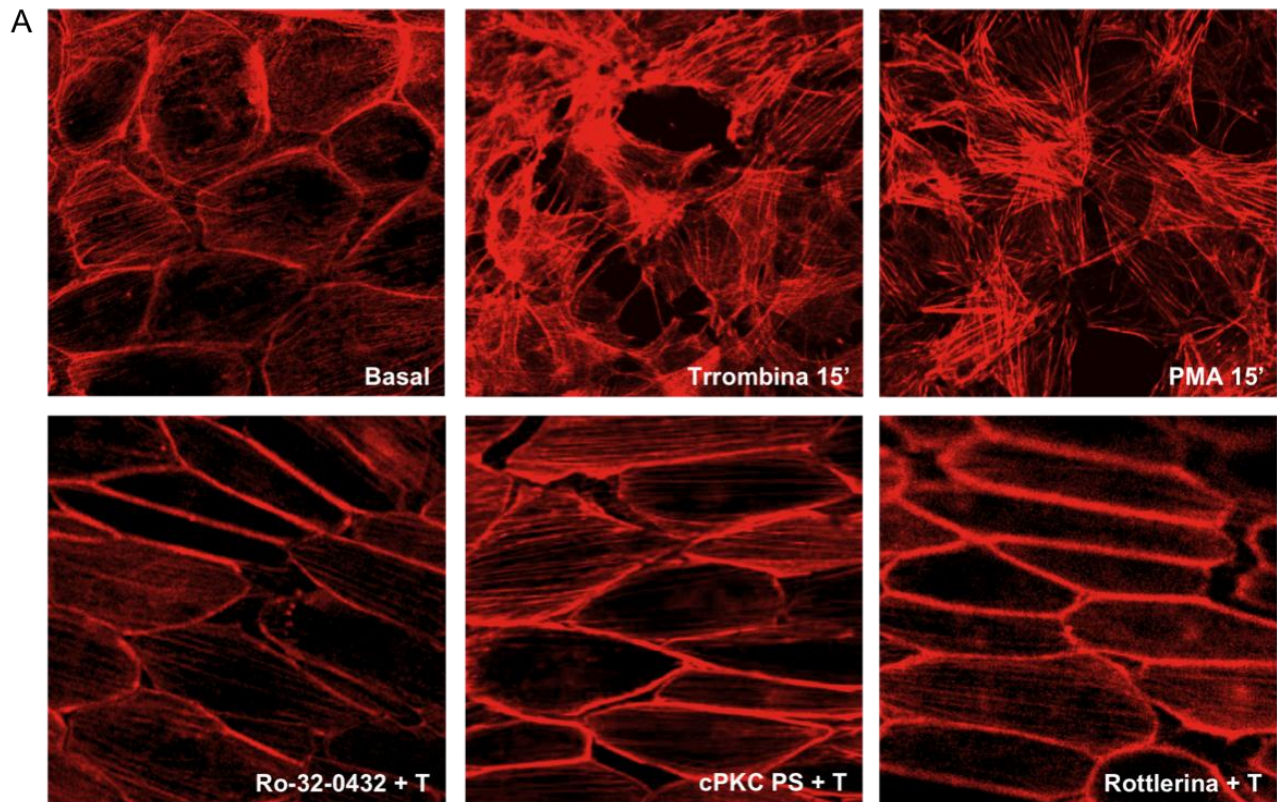


**Figura 16. La inhibición de la fosforilación de la MLC impide la formación de fibras de estrés de actina inducida por trombina. A)** Las células del EPR se privaron de suero durante 24 horas y posteriormente se trataron con los siguientes inhibidores durante 30 minutos antes de la estimulación con trombina (2 U/mL por 15 minutos): Y-27632 (5  $\mu$ M) para ROCK, ML-7 (50  $\mu$ M) para la MLCK, y aPKC PS (25  $\mu$ M) para la PKC $\zeta$ . La trombina y su inhibidor específico, la hirudina, se co-incubaron a 37°C por 30 minutos previos a la estimulación con trombina. **B)** Cuantificación de la inmunofluorescencia relativa de F-actina observada en A). Los valores de la fluorescencia de las células estimuladas con trombina se establecieron



como el 100%. Los resultados representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar de 3 experimentos independientes. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , prueba de t de Student. **B:** T, trombina; H, hirudina; Y, Y-27632; M, ML-7.

Congruente con el resultado anterior, mientras que la inhibición de las PKC convencionales (Ro-32-0432 y cPKC PS) y de la PKC $\delta$  (rottlerina) resultó en una reducción significativa del número de fibras de estrés formadas (Figuras 17 A y B); la activación de estas isoformas mediada por el PMA promovió su ensamble.



**Figura 17. La trombina induce el ensamble de fibras de estrés de actina a través de las isoformas convencionales y nueva ( $\delta$ ) de la PKC. A)** Las células del EPR se privaron de suero durante 24 horas, y después de incubaron por 30 minutos con los siguientes inhibidores antes de la estimulación con trombina (2 U/mL durante 15 minutos): Ro-32-0432 (10  $\mu$ M) para las isoformas convencionales y nueva ( $\epsilon$ ) de la PKC, cPKC PS (50  $\mu$ M) para las isoformas convencionales de la PKC, y rottlerina (10  $\mu$ M) para la PKC $\delta$ . El PMA (1  $\mu$ M) promueve la formación de las fibras de estrés de actina, confirmando la participación de las isoformas c/n PKC en el efecto de la trombina. **B)** Cuantificación de la inmunofluorescencia relativa de F-actina observada en A). Los valores de la fluorescencia de las células estimuladas con trombina se establecieron como el 100%. Los resultados representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar de 3 experimentos independientes. \*\*\* $p < 0.001$  o ### $p < 0.001$  (basal versus PMA), prueba de t de Student. **B:** T, trombina; Ro, Ro-32-0432; cPKC, cPKC PS; Rott, rottlerina.

## 7. DISCUSIÓN

### ***Intervención de la trombina en la patogénesis del EPR***

La ruptura de la barrera hematorretinina se ha establecido como un factor clave en el desarrollo de varias enfermedades oculares, como la degeneración macular relacionada con la edad (Bian et al., 2007), la retinopatía diabética (Miyamoto et al., 2007) y la VRP (Chang et al., 1997). La alteración de la permeabilidad como consecuencia del rompimiento permite el contacto de la retina y el EPR con la trombina y otros componentes del suero sanguíneo (Nagasaki et al., 1998; Sakamoto et al., 1994; Yoshida et al., 2001). Es interesante mencionar que la trombina ha sido utilizada como un agente terapéutico para controlar la hemorragia que ocurre durante la cirugía intra-ocular, así como para inducir la proliferación de células de la retina de pacientes con agujeros maculares; sin embargo, el tratamiento con esta proteasa frecuentemente resulta en una inflamación ocular severa (Yoshida et al., 2001). Aunque el efecto de la trombina sobre el funcionamiento de células endoteliales se ha estudiado con gran detalle (Coughlin, 2005; Dudek y García, 2001), su acción en el EPR es un tema de investigación reciente. Se sabe que en estas células la trombina participa en la inducción de procesos característicos de los trastornos fibroproliferativos, entre los que se incluyen la proliferación (Palma-Nicolas et al., 2008; Parrales et al., 2010), la migración (Palma-Nicolas et al., 2010), y la síntesis de mediadores inflamatorios y pro-angiogénicos, como interleucinas, factores quimio-atrayentes y VEGF (Bian et al., 2007; Hollborn et al., 2009; Palma-Nicolas et al., 2010; Yoshida et al., 2001). En línea con la posible participación de la trombina en el establecimiento de enfermedades oculares, Rehak et al. (2009) reportó la producción de protrombina en células de la retina neural y del EPR como respuesta a la oclusión de la rama venosa de la retina. Adicionalmente, se ha observado que las células del EPR expresan diferentes factores de la cascada de coagulación sanguínea, lo cual sugiere que estas células podrían sintetizar trombina a partir de la protrombina circulante (Hollborn et al., 2009). Sin embargo, no se ha analizado si en el EPR la trombina activa la maquinaria contráctil de la célula, la cual regula diversos procesos motores a través de la fosforilación de la MLC y la formación de fibras de estrés de actina (Clark et al., 2007). Por lo tanto, el objetivo de este trabajo consistió en determinar si la trombina induce la reorganización del citoesqueleto de actina en células del EPR de rata en cultivo, así como investigar las posibles vías de señalamiento involucradas en este proceso.

Los resultados de este estudio demostraron, por primera vez, que en células del EPR de rata en cultivo la trombina induce la fosforilación de la MLC de manera dependiente de la dosis y del tiempo (Figuras 5A y 5B) a través de la activación del receptor PAR-1 (Figura 6). La inhibición de la fosforilación de la MLC mediada por la hirudina (Figura 5C), así como la falta de efecto de los

péptidos agonistas de los receptores PAR-3 y/o PAR-4 (Figura 6), confirmaron la especificidad del tratamiento con trombina.

### ***Análisis de las vías de señalamiento involucradas en el control del citoesqueleto***

#### ***Participación de ROCK y de la MLCK***

La evidencia indica que la estimulación de los PARs mediada por la trombina tiene como consecuencia la activación de distintas vías de señalamiento involucradas en el establecimiento de numerosos padecimientos, entre los que se incluyen procesos inflamatorios, desórdenes neurológicos y el cáncer (Ando et al., 2007; Noorbakhsh et al., 2003; Ramachandran y Hollenberg, 2008; Steinhoff et al., 2005). Específicamente, el acoplamiento del receptor PAR-1 con las proteínas  $G_q$  y  $G_{12/13}$  induce la activación de cascadas de señalamiento que conducen a la estimulación concurrente de la MLCK y de ROCK, respectivamente (Macfarlane et al., 2001). Mientras que la activación de la MLCK mediada por  $Ca^{2+}/CaM$  resultaría en un aumento en la fosforilación de la MLC, la de ROCK contribuiría a este proceso mediante la inactivación de la MLC o la fosforilación directa de la MLC (Somlyo y Somlyo, 2003).

En este trabajo, se analizó la participación de dichas cinasas en la fosforilación de la MLC inducida por trombina. Los resultados indican que, aunque ambas proteínas regulan el efecto de la trombina, el señalamiento mediado por ROCK es predominante, ya que su inhibición con el compuesto Y-27632 impidió completamente la fosforilación de la MLC inducida por la trombina (Figura 7B), mientras que la inhibición de la MLCK con el fármaco ML-7 impidió parcialmente dicho efecto (Figura 8A). Estos hallazgos concuerdan con un reporte previo, en el cual la fosforilación de la MLC inducida por estrés hiperosmótico en células epiteliales de riñón depende de la activación de ROCK, dado que el compuesto Y-27632 tiene un efecto supresor más potente que el ML-7 (Di Ciano-Oliveira et al., 2003). En contraste, la fosforilación de la MLC en células epiteliales de intestino (Russo et al., 2005), así como en células de músculo liso (Kamm y Stull, 2001), está bajo el control de la MLCK. Estos datos controvertidos sugieren que el mecanismo principal que lleva a la fosforilación de la MLC se relaciona con la variación específica de  $Ca^{2+}$  inducida por el agonista en cuestión (Feng et al., 1999a), o bien de diferencias en la afinidad de ROCK ( $K_m = 2.47 \pm 0.34 \mu M$ ) y de la subunidad MYPT1 ( $K_m = 0.10 \pm 0.01 \mu M$ ) por la MLC, en comparación con la MLCK ( $K_m = 34.5 \pm 2.8 \mu M$ ) (Feng et al., 1999b). Adicionalmente, podría deberse a diferencias en la distribución intracelular de la MLCK y ROCK, como lo demuestran modelos de migración de fibroblastos o de reparación de heridas epiteliales, en los que la actividad de ROCK es responsable del ensamble de fibras de estrés de actina en el centro, mientras que la MLCK induce la formación de filamentos en la periferia (Russo et al., 2005; Totsukawa et al., 2004). Aunque se examinó esta posibilidad en el EPR de rata, no se detectaron

diferencias significativas en la distribución subcelular de las fibras de estrés de actina en células pre-incubadas con los inhibidores de ROCK o de la MLCK (Figura 16A). En conjunto, estos resultados sugieren que aunque ambas vías controlan la fosforilación de la MLC, la regulación de este proceso varía dependiendo del tipo celular y del agonista utilizado.

Se ha demostrado que las subunidades  $G_{\alpha12}$  y  $G_{\alpha13}$  promueven la formación de fibras de estrés de actina a través de la activación de la GTPasa Rho (Sah et al., 2000). En este estudio, se demostró que la trombina induce la activación de RhoA (Figura 7A), probablemente a través de la estimulación de las proteínas  $G_{12/13}$  acopladas al receptor PAR-1, y la activación consecuente de miembros de la familia de los Rho-GEFs, como p115RhoGEF, PDZ-RhoGEF, Rho-GEF asociado a la leucemia, y Lbc (Birukova et al., 2004; Majumdar et al., 1999; Siehler et al., 2009). En este contexto, se ha observado que mutantes constitutivamente activos de  $G_{\alpha12/13}$  inducen la formación de fibras de estrés de actina a través de Rho, mientras que la incubación con anticuerpos  $\alpha$ - $G_{\alpha12/13}$  suprimen este efecto (Majumdar et al., 1999; Sah et al., 2000).

ROCK, la primera proteína efectora de la GTPasa Rho en ser descubierta, fue caracterizada inicialmente por su participación en el rearreglo del citoesqueleto de actina como respuesta a la activación de RhoA (Ishizaki et al., 1996; Leung et al., 1996). Estudios subsecuentes demostraron que varios agentes, especialmente el ácido lisofosfatídico y la trombina, estimulaban la formación de fibras de estrés de actina y de complejos de adhesión focal en diversos tipos celulares a través de la fosforilación de la MLC mediada por la vía Rho/ROCK (Amano et al., 1997; Essler et al., 1998). Aunque ROCK puede fosforilar directamente a la MLC *in vitro* (Amano et al., 1996), se ha propuesto que *in vivo* actúa al fosforilar a la subunidad MYPT1 de la MLCP, lo que resulta en la inhibición de la actividad catalítica de la fosfatasa (Amano et al., 2010; Sah et al., 2000). Los resultados de este estudio demostraron que la trombina induce la activación de RhoA (Figura 7A) y la fosforilación tanto de la MLC (Figura 5B) como de la subunidad MYPT1 de la MLCP (Figura 7C) de manera coincidente en el tiempo. Adicionalmente, la inhibición de ROCK con el fármaco Y-27632 impidió la fosforilación de la MLC y la fosforilación de la subunidad MYPT1 (Figuras 7B y 7D) inducidas por trombina, lo que sugiere que la vía de señalamiento conformada por Rho/ROCK/MYPT1 conduce al aumento en la fosforilación de la MLC como respuesta a la trombina en células del EPR de rata. Es importante notar que, además de su efecto sobre la fosforilación de la MLC, ROCK puede fosforilar otros componentes que regulan la dinámica del citoesqueleto de actina, entre los que se incluyen las cinasas LIM, la aducina, el complejo ERM, y proteínas de las uniones estrechas y adherentes (Mueller et al., 2005; Riento y Ridley, 2003; Wójciak-Stothard et al., 2001; Yamamoto et al., 2008).

La inhibición parcial de la fosforilación de la MLC observada al pre-incubar a las células del EPR con el ML-7 (Figura 8A), indica la participación de la MLCK en la fosforilación de la MLC inducida

por trombina. Es probable que la elevación del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, mediada por la  $\text{PLC}\beta$ , promueva la activación de esta enzima. Los resultados mostraron que la inhibición de la  $\text{PLC}\beta$  con el fármaco U73122 impidió la fosforilación de la MLC inducida por trombina en la misma medida que el ML-7 (Figura 8B). Estos datos sugieren que el aumento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, derivado de la estimulación de la vía  $\text{G}_{\alpha\text{q}}/\text{PLC}\beta$ , conduce a la activación de la CaM/MLCK en células del EPR tratadas con trombina.

#### *Activación de las isoformas de la PKC y su proteína efectora CPI-17*

La formación de fibras de estrés de actina y el desensamble de las proteínas que conforman las uniones estrechas de monocapas celulares se han relacionado con la activación de la PKC; sin embargo, las isoformas participantes y el mecanismo involucrado varían de acuerdo con el tipo celular y las condiciones del cultivo (Harhaj y Antonetti, 2004). Los primeros estudios referentes al funcionamiento del receptor PAR-1 demostraron la activación de la  $\text{PLC}\beta$  mediada por la proteína  $\text{G}_{\alpha\text{q}}$  como un evento característico de la estimulación con trombina. Como consecuencia de la hidrólisis de fosfoinosítidos mediada por la  $\text{PLC}\beta$  se forman  $\text{IP}_3$  y DAG, los cuales promueven la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplásmico y la activación de las isoformas convencionales y nuevas de la PKC (Macfarlane et al., 2001). Adicionalmente, se sabe que la trombina contribuye con la activación de la PKC mediante otros mecanismos, los cuales incluyen: i) la generación de segundos mensajeros lipídicos vía la  $\text{PLC}\gamma$ , la PLD, la  $\text{PLA}_2$  y la PL específica de fosfatidilcolina (Macfarlane et al., 2001); y ii) la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales catiónicos no selectivos localizados en la membrana plasmática (Singh et al., 2007).

Varios estudios han relacionado la activación de distintas isoformas de la PKC mediada por la trombina con el daño al tejido cerebral y pulmonar (Cui et al., 2011; Siflinger-Birnboim y Johnson, 2003), la arteriosclerosis (Hsieh et al., 2009) y la migración de células tumorales (Chen et al., 2010). En el ojo, las isoformas  $\beta$ ,  $\delta$  y  $\zeta$  de la PKC promueven la disfunción vascular y el establecimiento del edema macular observados en la retinopatía diabética (Amadio et al., 2010; Bursell et al., 1997; Kim et al., 2005; Kim et al., 2010). Asimismo, el señalamiento mediado por la PKC regula la proliferación, migración, fagocitosis y contracción de células del EPR, sugiriendo la participación de esta familia de cinasas en el desarrollo de la VRP (Yu et al., 2007). Específicamente, se ha demostrado que el efecto de la trombina sobre la proliferación y migración de las células del EPR requiere de la activación de las isoformas convencionales y atípica ( $\zeta$ ) de la PKC (Palma-Nicolas et al., 2008; Palma-Nicolas et al., 2010; Parrales et al., 2010); sin embargo, la contribución de cada isoforma al proceso de contracción de la actina-miosina no ha sido esclarecida. En el EPR de rata se ha detectado la expresión de las isoenzimas  $\alpha$ ,  $\beta\text{I}$ ,  $\beta\text{II}$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  y  $\zeta$

de la PKC (Wood y Osborne, 1998), por lo que en este trabajo se investigó si la trombina induce la fosforilación de la MLC a través del señalamiento mediado por dichas isoformas.

Los resultados demostraron que las isoformas convencionales de la PKC, particularmente la PKC $\alpha$  y la PKC $\beta$ , se activan como respuesta a la trombina y promueven la fosforilación de la MLC. Esta conclusión se obtuvo a partir de experimentos en los que el efecto de la trombina se inhibió completamente al pre-incubar a las células del EPR con un péptido miristoilado que contiene la región pseudosustrato de la PKC $\alpha$  y la PKC $\beta$  (Figura 9B). Estos resultados concuerdan con evidencia previa que propone a la PKC $\alpha$  como un mediador clave en la interrupción de la barrera endotelial inducida por trombina (Siflinger-Birnboim y Johnson, 2003). En células HUVEC la PKC $\alpha$ , no así la PKC $\epsilon$ , estimulan el señalamiento de Rho al inactivar al modulador negativo Rho-GDI (Mehta et al., 2001). En la misma línea celular, la reorganización del citoesqueleto de actina mediada por la PKC $\alpha$  incluye la activación del p115RhoGEF (Holinstat et al., 2003); así como la interrupción de la VE-cadherina (Sandoval et al., 2001).

Entre las nPKC, la PKC $\delta$  se ha asociado con la regulación de la dinámica del citoesqueleto de actina (Liedtke et al., 2003; Pool y Furness, 2007), y con la migración celular (Li et al., 2003). En este trabajo se demostró que la inhibición de la PKC $\delta$  con rottlerina impidió la fosforilación de la MLC inducida por trombina (Figura 10A), mientras que la inhibición de la PKC $\epsilon$  no tuvo efecto. Aunque recientemente se ha cuestionado la especificidad de la rottlerina debido a su efecto como desacoplante de la cadena respiratoria (Soltoff, 2007), descartamos un posible efecto tóxico de este fármaco mediante ensayos de viabilidad celular. Además, para confirmar la participación específica de la PKC $\delta$  en el efecto de la trombina, se impidió su activación con un péptido inhibidor de la translocación ( $\delta$ V1-1). Los resultados demostraron que la pre-incubación de las células del EPR con este péptido también impidió la fosforilación de la MLC inducida por trombina (Figura 10B), de acuerdo con un estudio de Iwabuchi et al. (2004) en el que se demostró que la fosforilación de la MLC inducida por el EGF se inhibió al suprimir la actividad de la PKC $\delta$ . De igual forma, se ha propuesto que la activación de la PKC $\delta$  mediada por RhoA conduce a la formación de fibras de estrés de actina en células epiteliales de intestino estimuladas con el leucotrieno D<sub>4</sub> (Massoumi et al., 2002).

Por otra parte, existe evidencia que involucra a la PKC $\zeta$  en la regulación del citoesqueleto de actina. Por ejemplo, se ha observado que la vía de señalamiento PI3K/PKC $\zeta$  regula la contracción de células miometriales inducida por la endotelina 1 (Di Liberto et al., 2003). Los resultados de dicho estudio demuestran la co-localización de la PKC $\zeta$  con los microfilamentos, lo cual sugiere a la actina, o proteínas de unión a la actina, como posibles blancos de fosforilación de esta isoenzima. Otros estudios en este sentido han propuesto que la activación de la PKC $\zeta$  mediada por Rho regula la polimerización de la actina en neutrófilos expuestos a moléculas quimio-

atrayentes (Laudanna et al., 1998), así como en células T estimuladas con IL-2 (Gómez et al., 1997). Adicionalmente, se ha observado que la trombina induce un incremento en la permeabilidad de células endoteliales a través de la activación de la PKC $\zeta$  de manera independiente de Rho (Li et al., 2004). Los resultados demostraron que la fosforilación de la MLC inducida por trombina se impidió totalmente cuando pre-incubamos a las células del EPR con un péptido miristoilado que contiene la región pseudosustrato de las aPKC (Figura 12). Lo mismo se observó en células de músculo liso, en las que la fosforilación de la MLC inducida por fenilefrina o ácido araquidónico se impidió cuando la PKC $\zeta$  está inactiva (Gailly et al., 1997).

La trombina activa el señalamiento mediado por la PI3K en numerosos tipos celulares (Macfarlane et al., 2001), entre los que se incluyen las células del EPR (Palma-Nicolas et al., 2008), a través de un proceso que requiere de la estimulación de las subunidades G $\beta\gamma$  acopladas al receptor PAR-1. Dado que la PI3K promueve la activación de la PKC $\zeta$  mediante la producción de PIP $_3$  (Hirai y Chida, 2003), se probaron distintos inhibidores de esta enzima y se evaluó la fosforilación de la MLC inducida por trombina. La inhibición farmacológica de dicha cinasa con wortmannina o con LY294002 impidió el efecto de la trombina (Figura 12), lo cual sugiere que la PI3K activa a la PKC $\zeta$  en células del EPR de rata. Por lo tanto, la estimulación conjunta de RhoA y de la PI3K en respuesta a la trombina, podría mediar la activación de la PKC $\zeta$  en células del EPR. De manera alternativa, la PI3K podría inducir la fosforilación de la MLC a través de ILK, cinasa que es capaz de fosforilar directamente a la MLC (Deng et al., 2001), o que también puede fosforilar a la proteína CPI-17 (Huang et al., 2006).

Una de las principales moléculas efectoras de la PKC, que se sabe promueve la contracción de los filamentos de actina-miosina, es la proteína CPI-17. Cuando esta fosforilada en el residuo Thr38, esta proteína se une al sitio activo de la MLCP, suprimiendo su actividad (Eto, 2009). La activación/fosforilación de la proteína CPI-17 se ha relacionado principalmente con la contracción de células de músculo liso estimuladas con diversos agonistas (Eto et al., 2001; Kitazawa et al., 2000; Murthy et al., 2003; Ohama et al., 2003; Patil y Bitar, 2006). En este sentido, el nivel de expresión de la proteína CPI-17, que es más elevado en músculos tónicos en comparación con músculos fásicos, se correlaciona con el grado de contracción inducido por la PKC (Kitazawa et al., 1999; Woodsome et al., 2001). Aunque esta proteína se expresa de manera predominante en células de músculo liso, también se ha detectado en células no musculares (Eto et al., 2009); en donde su activación se relaciona con procesos como: la secreción de plaquetas (Watanabe et al., 2001), la depresión sináptica a largo plazo de células de Purkinje (Eto et al., 2002); la interrupción de la barrera formada por células endoteliales (Kolossova et al., 2004; Srinivas et al., 2006); y la transformación de células tumorales (Jin et al., 2006). Notablemente, la proteína CPI-17 se considera un blanco terapéutico, ya que el nivel de su expresión y/o fosforilación se eleva en



varias condiciones patológicas, entre las que se incluyen: el cáncer, la hipertensión pulmonar, el asma y la disfunción de células de músculo liso relacionada con la diabetes (Eto, et al., 2007). A pesar de su importancia, la función de esta proteína en el EPR se desconoce. Este es el primer estudio que demuestra la expresión funcional de la proteína CPI-17 en células de EPR de rata. Dado que en nuestro sistema la trombina induce la fosforilación de la proteína CPI-17 con un curso temporal que se correlaciona de manera precisa con la cinética de activación de la MLC (Figuras 5B y 13), se sugiere que ambos procesos están acoplados.

La proteína CPI-17 se ha propuesto como un posible sustrato de todas las isoformas de la PKC (Zemlickova et al., 2004). En este trabajo se demostró que la inhibición farmacológica de las PKC convencionales y de la PKC $\delta$  impidió totalmente la fosforilación de la proteína CPI-17 inducida por trombina (Figura 14A). Adicionalmente, el PMA indujo la fosforilación de la proteína CPI-17 a través de las isoformas convencionales y nueva ( $\delta$ ) de la PKC (Figuras 14C y 14D), confirmando la participación de las isoenzimas sensibles al DAG en el efecto de la trombina. Estos resultados concuerdan con estudios previos que demuestran la activación de la proteína CPI-17, mediada por las c/n PKC, durante la contracción intestinal (Murthy et al., 2003), miométrial (Ozaki et al., 2003) y del músculo liso (Eto et al., 2001); así como en la reorganización del citoesqueleto de actina de células endoteliales (Kolossova et al., 2004). El bloqueo farmacológico de la PI3K o de la PKC $\zeta$ , también impidió la fosforilación de la proteína CPI-17 inducida por trombina, probablemente al prevenir la activación de la PKC $\zeta$  mediada por la PI3K (Figura 14B). Sin embargo, hay evidencia controvertida con respecto a la fosforilación de la proteína CPI-17 inducida por trombina, ya que en células vasculares de músculo liso este efecto se impidió al inhibir a ROCK, pero no así a la PKC (Pang et al., 2005). En este contexto, la inhibición de ROCK en células del EPR resultó en una disminución de  $\approx 25\%$  en la fosforilación de la proteína CPI-17 inducida por trombina (Figura 14A), de acuerdo con datos obtenidos en fibroblastos estimulados con suero (Ren et al., 2004). Además, estos resultados son consistentes con trabajos previos en los que se ha demostrado que ROCK tiene una mayor afinidad por la subunidad MYPT1 ( $K_m = 0.10 \pm 0.1 \mu\text{M}$ ) que por la proteína CPI-17 ( $K_m = 1.42 \pm 0.25 \mu\text{M}$ ) (Feng et al., 1999b; Koyama et al., 2000). En conjunto, los resultados sugieren que en células del EPR de rata ROCK es responsable de inactivar a la MLCP mediante la fosforilación de la subunidad MYPT1, mientras que la familia de la PKC controla la inhibición de la subunidad catalítica de la fosfatasa a través de la activación de la proteína CPI-17. Con respecto al posible efecto redundante de las isoformas de la PKC, observamos que la inhibición individual de cada subfamilia bloqueó totalmente el efecto de la trombina sobre la activación de la proteína CPI-17, así como sobre la fosforilación de la MLC. Esto sugiere que las isoformas de la PKC no actúan de manera aislada, sino que se intercomunican para integrar funcionalmente el señalamiento intracelular (Steinberg, 2008). En este sentido, es importante

resaltar que tanto la PKC $\alpha$  (Holinstat et al., 2003; Mehta et al., 2001), como la PKC $\zeta$  (Minshall et al., 2010), promueven la activación de Rho en células endoteliales estimuladas con trombina. Además, la PKC $\delta$  (Massoumi et al., 2002) y la PKC $\zeta$  (Gómez et al., 1997; Laudanna et al., 1998), se han propuesto como proteínas efectoras de Rho en células epiteliales y del sistema inmune, respectivamente. Por lo tanto, es factible pensar que isoformas particulares de la PKC, situadas en distintos niveles de las vías de señalamiento activadas por la trombina, coincidan en la fosforilación de la MLC a través de la activación de la proteína CPI-17 y/o la GTPasa Rho, ya que ambos procesos ocurren en estas células. Congruente con estos resultados, otros estudios han demostrado que distintas isoenzimas de la PKC median el mismo efecto. Por ejemplo, la depleción de la PKC $\alpha$  o de la PKC $\epsilon$  mediante ensayos de RNA de interferencia suprimió la reorganización del citoesqueleto de actina y el crecimiento celular inducidos por trombina en cardiomiocitos de rata (Otani et al., 2011), mientras que el bloqueo de la PKC $\epsilon$  o de la PKC $\delta$  impidió parcialmente la contracción de geles de colágena de fibroblastos de pulmón estimulados con esta proteasa (Fang et al., 2008). Adicionalmente, la inhibición de la PKC $\alpha/\beta$  con el compuesto Gö 6976, o la inhibición de la PKC $\delta$  con rottlerina, impidió la activación de la PLD inducida por bradicinina en células cancerosas de la línea A-431; mientras que la pre-incubación con un péptido inhibidor de la PKC $\alpha$  o rottlerina redujo significativamente la producción de especies reactivas de oxígeno en células renales tratadas con oxalato (Vijayalakshmi et al., 2009). Asimismo, la pre-incubación de plaquetas con el compuesto GF109203X, un potente inhibidor de las c/n PKC, con Gö 6976 para las isoformas convencionales, o con rottlerina para la PKC $\delta$ , impidió la internalización del receptor purinérgico P2Y $_1$  estimulada por el PMA (Mundell et al., 2006).

La activación tanto de las isoformas convencionales como de las nuevas de la PKC depende de la generación de segundos mensajeros lipídicos, lo que ha dificultado diferenciar el funcionamiento particular de las ocho isoformas que constituyen estas dos subclases. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que el señalamiento mediado por la PKC está controlado por el nivel de actividad de las fosfatasa y por la persistencia del DAG en compartimientos intracelulares específicos. Además, se ha observado que la afinidad del módulo C1 de las nPKC por el DAG es dos órdenes de magnitud mayor que el de las cPKC, lo que permite a las isoformas nuevas activarse con concentraciones menores de DAG (Gallegos y Newton, 2008). Los resultados derivados de la estimulación con PMA apoyan esta suposición: mientras que la PKC $\delta$  se activa con 50 nM de PMA, la actividad de las cPKC requiere de una concentración mayor del éster de forbol (Figuras 11B y 11C). De acuerdo con la evidencia anterior, la participación de la PKC $\delta$  en diferentes procesos celulares depende de su localización intracelular. La activación de esta isoenzima en la membrana resulta de la formación de DAG, mientras que su activación en el

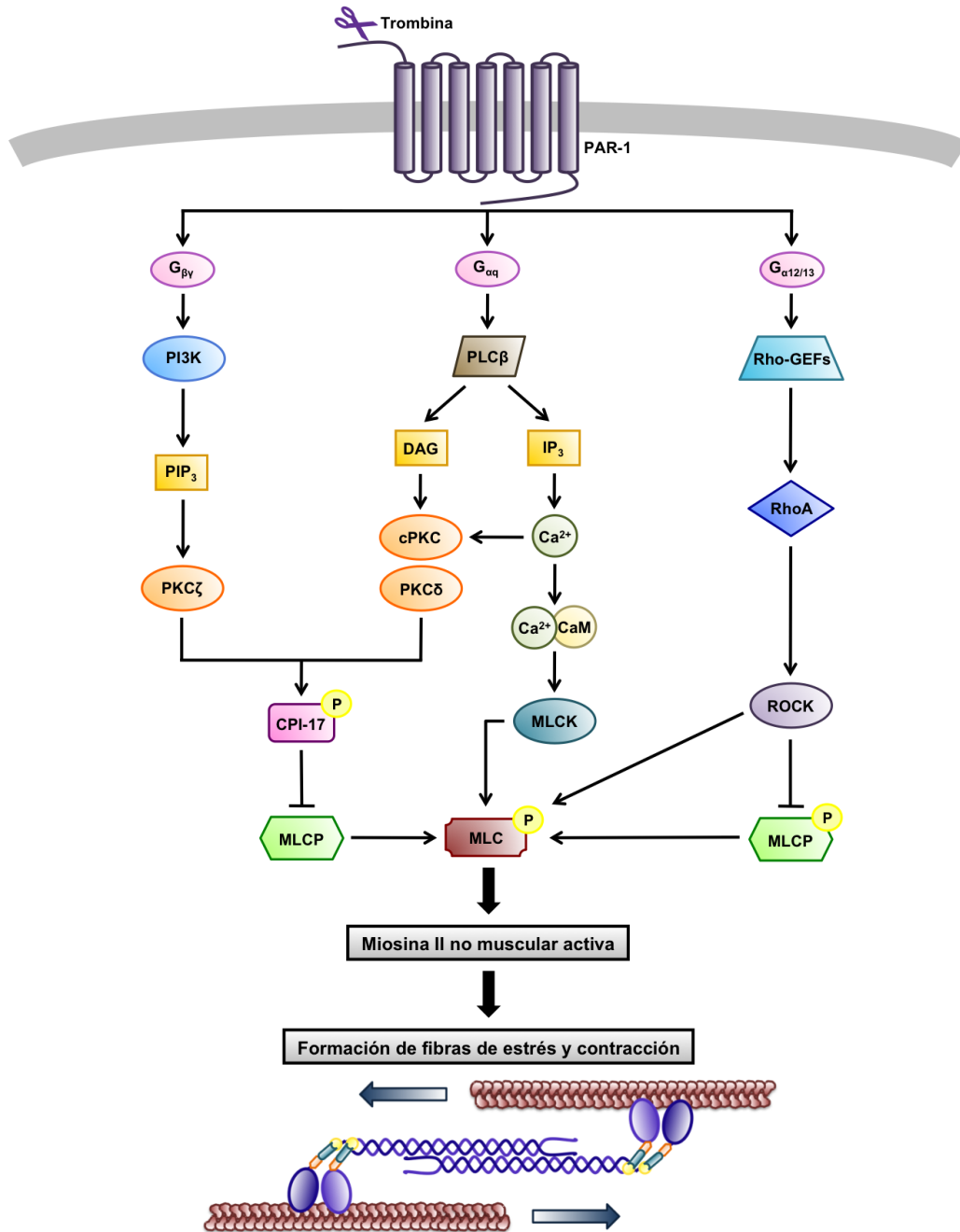
núcleo requiere de la fosforilación de Src (Kajimoto et al., 2010). La falta de efecto del fármaco PP2 sobre la fosforilación de la MLC en células estimuladas con trombina (Figura 11D), sugiere la producción de DAG como el mecanismo que regula el señalamiento PKC $\delta$ /MLC en el EPR de rata.

### ***Transformación fenotípica de las células del EPR***

Los cambios en la estructura y composición del citoesqueleto de actina son indicadores de situaciones patológicas, como se observa en las enfermedades fibróticas y el cáncer, caracterizados por la transición epitelio-mesénquima de las células. Este proceso involucra la pérdida de la polaridad epitelial, la formación de fibras de estrés de actina y la redistribución de organelos, cambios que permiten a las células adoptar un fenotipo altamente móvil e invasivo (Chaponier y Gabbiani, 2004; Moustakas y Heldin, 2005; Thiery, 2003). Además de inducir la fosforilación de la MLC, en este estudio se demostró que la trombina promueve el ensamble de fibras de estrés de actina en células del EPR de rata. La cinética de activación de ambos procesos sigue un curso similar (Figuras 5B y 15), lo cual sugiere una relación causal entre la fosforilación de la MLC con la polimerización de la actina. Dado que la NM-II favorece el entrecruzamiento de los filamentos de actina (Chrzanowska-Wodnicka y Burridge, 1996; Riento y Ridley, 2003), después se evaluó la formación de las fibras de estrés en la presencia de los inhibidores farmacológicos que impidieron la fosforilación de la MLC. Los resultados mostraron que la inhibición de la fosforilación de la MLC inducida por trombina, mediante el bloqueo farmacológico de la MLCK, ROCK, c/n PKC o PKC $\zeta$ , impidió la formación de fibras de estrés de actina (Figuras 16 y 17), como se observa en células endoteliales (Birukova et al., 2004; Minshall et al., 2010; Nobe et al., 2005) y epiteliales (Gavara et al., 2006; Sakamoto et al., 1994) estimuladas con esta proteasa. Estos datos sugieren que la trombina podría contribuir con el establecimiento de la VRP al inducir el ensamble de filamentos contráctiles de actina-miosina en células del EPR.

Los resultados mostraron que en células del EPR de rata, la activación del receptor PAR-1 mediada por la trombina estimula una compleja red de señalamiento en la que las distintas vías convergen en la fosforilación de la MLC. El posible mecanismo mediante el cual la trombina induce la fosforilación de la MLC en células del EPR de rata se resume en la Figura 18: la acción proteolítica de la trombina sobre el receptor PAR-1 activa a las proteínas G $_{12/13}$ , G $_q$  y G $_i$ . La estimulación de RhoGEFs mediada por las subunidades G $_{\alpha_{12/13}}$  induce la activación de la GTPasa RhoA, que a su vez promueve la activación de ROCK. Mediante la fosforilación de la subunidad MYPT1, ROCK inhibe a la MLCP, permitiendo un aumento significativo en el nivel de fosfo-MLC. Paralelamente, la vía G $_{\alpha_q}$ /PLC $\beta$  induce la formación de IP $_3$  y DAG a través de la hidrólisis de

fosfoinosítidos. La elevación de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular mediada por el  $\text{IP}_3$  lleva a la subsecuente activación de la CaM/MLCK, enzima que incrementa la fosforilación de la MLC. Adicionalmente, el DAG y el aumento de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  estimulan a las isoformas convencionales y nueva ( $\delta$ ) de la PKC, mientras que las subunidades  $G_{\beta\gamma}$  controlan la activación de la PKC $\zeta$  a través de una vía dependiente de PI3K. Miembros pertenecientes a todas las clases de la PKC pueden fosforilar/activar a la proteína CPI-17, que al inhibir la actividad catalítica de la MLCP, contribuye a aumentar el nivel de la MLC fosforilada. Finalmente la fosforilación de la MLC inducida por la activación de estas vías de señalamiento promueve la formación de fibras de estrés de actina, evento requerido para la contracción y motilidad celulares.



**Figura 18. Vías de señalamiento que conducen a la fosforilación de la MLC en células del EPR de rata estimuladas con trombina.** La explicación se detalla en el texto. CaM, calmodulina; CPI-17, proteína inhibidora de PP1 potenciada por la PKC de 17 kDa; cPKC, PKC convencionales; DAG, diacilglicerol; IP<sub>3</sub>, inositol 1,4,5-trifosfato; MLCK, cinasa de la MLC dependiente de Ca<sup>2+</sup>/calmodulina; MLCP, fosfatasa de la MLC; PAR-1 receptor activado por proteasas 1; PI3K, fosfatidilinositol 3'-cinasa; PIP<sub>3</sub>, fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato; PKC, proteína cinasa C; PLC $\beta$ , fosfolipasa C $\beta$ ; RhoGEFs, factores de intercambio de nucleótidos de guanina para la GTPasa Rho; ROCK, cinasas de Rho.

## 8. CONCLUSIONES

Cuando aumenta la concentración de trombina en el espacio subretinal como respuesta a un daño, las células del EPR proliferan y migran, procesos claves en el establecimiento de desórdenes fibroproliferativos de la retina. Dado que la generación de fuerza mecánica en las células depende de la contracción de los filamentos de actina-miosina, en este estudio se investigó el posible efecto de la trombina sobre las vías de señalamiento que controlan la fosforilación de la MLC en células del EPR de rata en cultivo. Los resultados de este trabajo demostraron que:

- ♦ La trombina induce la fosforilación de la MLC de manera dependiente del tiempo y de la dosis a través de la activación específica del receptor PAR-1.

- ♦ La estimulación del receptor PAR-1 mediada por la trombina resulta en la activación de múltiples vías de señalamiento que convergen en la fosforilación de la MLC, las cuales incluyen:

- i) Rho/ROCK/MLCP.

- ii) PLC $\beta$ /Ca<sup>2+</sup>-CaM/MLCK.

- iii) PKC/CPI-17/MLCP. Es el primer estudio en el que se reporta la expresión funcional de la proteína CPI-17 en células del EPR.

- ♦ La trombina promueve el ensamble de filamentos contráctiles de actina-miosina. Este evento depende de la activación de las vías de transducción que inducen la fosforilación de la MLC.

Estos hallazgos indican que la trombina está involucrada en la transformación de las células del EPR a través de la activación de vías de señalamiento que conducen a la fosforilación de la MLC y a la formación de fibras de estrés de actina. Además de activar la maquinaria contráctil de la célula, la trombina induce la proliferación y la migración de las células del EPR (Palma-Nicolas et al., 2010; Parrales et al., 2010), lo cual sugiere que esta proteasa tiene un papel relevante durante la respuesta inflamatoria producida como consecuencia de la ruptura de la barrera hematorretiniana, y por lo tanto, podría contribuir al desarrollo de la VRP.

La caracterización de los mecanismos intracelulares que controlan la actividad de la NM-II ha permitido la identificación de nuevos blancos de intervención terapéutica, entre los que destacan ROCK, la MLCK y la proteína CPI-17, para el tratamiento de padecimientos que involucran la hipercontractilidad de células de músculo liso, la interrupción de la barrera formada por células endoteliales y epiteliales, los trastornos neurológicos y el cáncer (Dudek y Garcia, 2001; Eto et al.,

2007; Miura et al., 2006; Mueller et al., 2005; Narumiya et al., 2009; Turner et al., 2006; Wettschureck y Offermanns, 2002). De igual forma, es posible aplicar este principio al tratamiento de enfermedades retinianas en las que la función motora este alterada y en donde varias cascadas de señalamiento tienen como blanco a la MLC. Dentro de este rubro resulta interesante considerar a la PKC $\zeta$ , ya que su inhibición en células del EPR estimuladas con trombina impide la reorganización del citoesqueleto de actina, así como la proliferación (Palma-Nicolas et al., 2008) y la quimiotaxis (Palma-Nicolas et al., 2010), procesos característicos de los trastornos de tipo fibroproliferativo.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abe T, Sugano E, Saigo Y, Tamai M. Interleukin-1 $\beta$  and barrier function of retinal pigment epithelial cells (ARPE-19): aberrant expression of junctional complex molecules. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 2003;44:4097-4104.

Ablonczy Z, Crosson CE. VEGF modulation of retinal pigment epithelium resistance. *Exp Eye Res* 2007;85:762-771.

Allingham JS, Klenchin VA, Rayment I. Actin-targeting natural products: structures, properties and mechanisms of action. *Cell Mol Life Sci* 2006;63:2119-2134.

Amadio M, Bucolo C, Leggio GM, Drago F, Govoni S, Pascale A. The PKC $\beta$ /HuR/VEGF pathway in diabetic retinopathy. *Biochem Pharmacol* 2010;80:1230-1237.

Amano M, Chihara K, Kimura K, Fukata Y, Nakamura N, Matsuura Y, Kaibuchi K. Formation of actin stress fibers and focal adhesions enhanced by Rho-kinase. *Science* 1997;275:1308-1311.

Amano M, Ito M, Kimura K, Fukata Y, Chihara K, Nakano T, Matsuura Y, Kaibuchi K. Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J Biol Chem* 1996;271:20246-20249.

Amano M, Nakayama M, Kaibuchi K. Rho-kinase/ROCK: a key regulator of the cytoskeleton and cell polarity. *Cytoskeleton* 2010;67:545-554.

Ando A, Ueda M, Uyama M, Masu Y, Ito S. Enhancement of dedifferentiation and myoid differentiation of retinal pigment epithelial cells by platelet derived growth factor. *Br J Ophthalmol* 2000;84:1306-1311.

Ando S, Otani H, Yagi Y, Kawai K, Araki H, Fukuhara S, Inagaki C. Proteinase-activated receptor 4 stimulation-induced epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells. *Respir Res* 2007;8:31.

Araki S, Ito M, Kureishi Y, Feng J, Machida H, Isaka N, Amano M, Kaibuchi K, Hartshorne DJ, Nakano T. Arachidonic acid-induced Ca<sup>2+</sup> sensitization of smooth muscle contraction through activation of Rho-kinase. *Pflügers Arch – Eur J Physiol* 2001;441:596-603.

Bailey TA, Kanuga N, Romero IA, Greenwood J, Luthert PJ, Cheetham ME. Oxidative stress affects the junctional integrity of retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 2004;45:675-684.



Bando H, Ikuno Y, Hori Y, Sayanagi K, Tano Y. Mitogen-activated protein kinase (MAPK) and phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) pathways differently regulate retinal pigment epithelial cell-mediated collagen gel contraction. *Exp Eye Res* 2006;82:529-537.

Bian ZM, Elnér SG, Elnér VM. Thrombin-induced VEGF expression in human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 2007;48:2738-2746.

Birukova AA, Smurova K, Birukov KG, Kaibuchi K, Garcia JGN, Verin AD. Role of Rho GTPases in thrombin-induced lung vascular endothelial cells barrier dysfunction. *Microvasc Res* 2004;67:64-77.

Bock PE, Panizzi P, Verhamme IMA. Exosites in the substrate specificity of blood coagulation reactions. *J Thromb Haemost* 2007;5:81-94.

Bode W. Structure and interaction modes of thrombin. *Blood Cells, Mol, Dis* 2006;36:122-130.

Bodie SL, Ford I, Greaves M, Nixon F. Thrombin-induced activation of RhoA in platelet shape change. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;287:71-76.

Broustas CG, Grammatikakis N, Eto M, Dent P, Brautigan DL, Kasid U. Phosphorylation of the myosin-binding subunit of myosin phosphatase by Raf-1 and inhibition of phosphatase activity. *J Biol Chem* 2002;277:3053-3059.

Burnside B, Bost-Usinger L. The retinal pigment epithelial cytoskeleton. En: *The Retinal Pigment Epithelium*. Eds.: Marmor MF, Wolfensberger TJ. Oxford University Press; New York: 1998. p. 41-67.

Bursell SE, Chikako T, Clermont AC, Takagi H, Mori F, Ishii H, King GL. Specific retinal diacylglycerol and protein kinase C beta isoform modulation mimics abnormal retinal hemodynamics in diabetic rats. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 1997;38:2711-2720.

Campochiaro PA. Pathogenic mechanisms in proliferative vitreoretinopathy. *Arch Ophthalmol* 1997;115:237-241.

Campochiaro PA. Growth factors in the retinal pigment epithelium and retina. En: *The Retinal Pigment Epithelium*. Eds.: Marmor MF, Wolfensberger TJ. Oxford University Press; New York: 1998. p. 459-477.

Carlier MF. Control of actin dynamics. *Curr Opin Cell Biol* 1998;10:45-51.

Chang CW, Ye L, Defoe DM, Caldwell RB. Serum inhibits tight junction formation in cultured pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 1997;38:1082-1093.

Chaponnier C, Gabbiani G. Pathological situations characterized by altered actin isoform expression. *J Pathol* 2004;204:386-395.

Chen HT, Tsou HK, Tsai CH, Kuo CC, Chiang YK, Chang CH, Fong YC, Tang CH. Thrombin enhanced migration and MMPs expression of human chondrosarcoma cells involves PAR receptor signaling pathway. *J Cell Physiol* 2010;223:737-745.

Chen JS, Song JG. Bradykinin induces protein kinase C-dependent activation of phospholipase D in A-431 cells. *IUBMB Life* 2001;51:49-56.

Chen L, Hahn H, Wu G, Chen CH, Liron T, Schechtman D, Cavallaro G, Banci L, Guo Y, Bolli R, Dorn II GW, Mochly-Rosen D. Opposing cardioprotective actions and parallel hypertrophic effects of delta PKC and epsilon PKC. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:11114-11119.

Chew TL, Masaracchia RA, Goeckeler ZM, Wysolmerski RB. Phosphorylation of non-muscle myosin II regulatory light chain by p21-activated kinase ( $\gamma$ -PAK). *J Muscle Res Cell Motil* 1998;19:839-854.

Chrissobolis S, Sobey CG. Recent evidence for an involvement of Rho-kinase in cerebral vascular disease. *Stroke* 2006;37:2174-2180.

Chrzanowska-Wodnicka M, Burridge K. Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *J Cell Biol* 1996;133:1403-1415.

Clark K, Langeslag M, Figdor CG, van Leeuwen FN. Myosin II and mechanotransduction: a balancing act. *Trends Cell Biol* 2007;17:178-185.

Conti MA, Adelstein RS. Nonmuscle myosin II moves in new directions. *J Cell Sci* 2008;121:11-18.

Coughlin SR. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J Thromb Haemost* 2005;3:1800-1814.

Cui GY, Gao XM, Qi SH, Gillani A, Gao L, Shen X, Zhang YD. The action of thrombin in intracerebral hemorrhage induced brain damage is mediated via PKC $\alpha$ /PKC $\delta$  signaling. *Brain Res* 2011;1398:86-93.

de Melo Reis RA, Ventura AL, Schitine CS, de Mello MC, de Mello FG. Müller glia as an active compartment modulating nervous activity in the vertebrate retina: neurotransmitters and trophic factors. *Neurochem Res* 2008;33:1466-1474.

Deng J, Sutherland C, Brautigan DL, Eto M, Walsh MP. Phosphorylation of the myosin phosphatase inhibitors, CPI-17 and PHI-1, by integrin-linked kinase. *Biochem J* 2002;367:517-524.

Deng JT, Van Lierop JE, Sutherland C, Walsh MP.  $Ca^{2+}$ -independent smooth muscle contraction. *J Biol Chem* 2001;276:16365-16373.

Di Ciano-Oliveira C, Sirokmány G, Szászi K, Arthur WT, Masszi A, Peterson M, Rotstein OD, Kapus A. Hyperosmotic stress activates Rho: differential involvement in Rho kinase-dependent MLC phosphorylation and NKCC activation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003;285:C555-C566.

Di Liberto G, Dallot E, Parco EL, Cabrol D, Ferré F, Breuiller-Fouché M. A critical role for PKC $\zeta$  in endothelin-1-induced uterine contractions at the end of pregnancy. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003;285:C599-C607.

Dominguez R, Holmes KC. Actin structure and function. *Annu Rev Biophys* 2011;40:169-186.

Dudek SM, Garcia JGN. Cytoskeletal regulation of pulmonary vascular permeability. *J Appl Physiol* 2001;91:1487-1500.

Emmert DA, Fee JA, Goeckeler ZM, Grojean JM, Wakatsuki T, Elson EL, Herring BP, Gallagher PJ, Wysolmerski RB. Rho-kinase-mediated  $Ca^{2+}$ -independent contraction in rat embryo fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;286:C8-C21.

Erdódi F, Kiss E, Walsh MP, Stefansson B, Deng JT, Eto M, Brautigan DL, Hartshorne DJ. Phosphorylation of protein phosphatase type-1 inhibitory proteins by integrin-linked kinase and cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;306:382-387.

Essler M, Amano M, Kruse HJ, Kaibuchi K, Weber PC, Aepfelbacher M. Thrombin inactivates myosin light chain phosphatase via Rho and its target Rho kinase in human endothelial cells. *J Biol Chem* 1998;273:21867-21874.

Eto M, Kitazawa T, Matsuzawa F, Aikawa S, Kirkbride JA, Isozumi N, Nishimura Y, Brautigan DL, Ohki S. Phosphorylation-induced conformational switching of CPI-17 produces a potent myosin phosphatase inhibitor. *Structure* 2007;15:1591-1602.

Eto M, Kitazawa T, Yazawa M, Mukai H, Ono Y, Brautigan DL. Histamine-induced vasoconstriction involves phosphorylation of a specific inhibitor protein for myosin phosphatase by protein kinase C  $\alpha$  and  $\delta$  isoforms. *J Biol Chem* 2001;276:29072-29078.

Eto M, Ohmori T, Suzuki M, Furuya K, Morita F. A novel protein phosphatase-1 inhibitory protein potentiated by protein kinase C. Isolation from porcine aorta media and characterization. *J Biochem* 1995;118:1104-1107.

Eto M, Senba S, Morita F, Yazawa M. Molecular cloning of a novel phosphorylation-dependent inhibitory protein of protein phosphatase-1 (CPI17) in smooth muscle: its specific localization in smooth muscle. *FEBS Lett* 1997;410:356-360.

Eto M, Karginov A, Brautigan DL. A novel phosphoprotein inhibitor of protein type-1 phosphatase holoenzymes. *Biochemistry* 1999;38:16952-16957.

Eto M, Bock R, Brautigan DL, Linden DJ. Cerebellar long-term synaptic depression requires PKC-mediated activation of CPI-17, a myosin/moesin phosphatase inhibitor. *Neuron* 2002;36:1145-1158.

Eto M. Regulation of cellular protein phosphatase-1 (PP1) by phosphorylation of the CPI-17 family, C-kinase-activated PP1 inhibitors. *J Biol Chem* 2009;284:35273-35277.

Fang Q, Mao L, Kobayashi T, Wang X, Wyatt TA, Kim H, Liu X, Rennard SI. PKCdelta mediates thrombin-augmented fibroblast-mediated collagen gel contraction. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;369:1199-1203.

Feng J, Ito M, Ichikawa K, Isaka N, Nishikawa M, Hartshorne DJ, Nakano T. Inhibitory phosphorylation site for Rho-associated kinase on smooth muscle myosin phosphatase. *J Biol Chem* 1999a;274:37385-37390.

Feng J, Ito M, Kureishi Y, Ichikawa K, Amano M, Isaka N, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K, Hartshorne DJ, Nakano T. Rho-associated kinase of chicken gizzard smooth muscle. *J Biol Chem* 1999b;274:3744-3752.

Fernald RD. Evolving eyes. *Int J Dev Biol* 2004;48:701-705.

Foth BJ, Goedecke MC, Soldati D. New insights into myosin evolution and classification. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:3681-3686.

Fuhrmann S. Eye morphogenesis and patterning of the optic vesicle. *Curr Top Dev Biol* 2010;93:61-84.

Gailly P, Gong MC, Somlyo AV, Somlyo AP. Possible role of atypical protein kinase C activated by arachidonic acid in Ca<sup>2+</sup> sensitization of rabbit smooth muscle. *Journal of Physiology* 1997;500:95-109.

Gailly P, Wu X, Haystead TAJ, Somlyo AP, Cohen PTW, Cohen P, Somlyo AV. Regions of the 110-kDa regulatory subunit M<sub>110</sub> required for regulation of myosin-light-chain-phosphatase activity in smooth muscle. *Eur J Biochem* 1996;239:326-332.

Gal A, Li Y, Thompson DA, Weir J, Orth U, Jacobson SG, Apfelstedt-Sylla E, Vollrath D. Mutations in *MERTK*, the human orthologue of the RCS rat retinal dystrophy gene, cause retinitis pigmentosa. *Nat Genet* 2000;26:270-271.

Gallegos LL, Kunkel MT, Newton AC. Targeting protein kinase C activity reporter to discrete intracellular regions reveals spatiotemporal differences in agonist-dependent signaling. *J Biol Chem* 2006;281:30947-30956.

Gallegos LL, Newton AC. Spatiotemporal dynamics of lipid signaling: protein kinase C as a paradigm. *IUBMB Life* 2008;60:782-789.

Gallo G. Myosin II activity is required for severing-induced axon retraction in vitro. *Exp Neurol* 2004;189:112-121.

Gavara N, Sunyer R, Roca-Cusachs P, Farré R, Rotger M, Navajas D. Thrombin induced contraction in alveolar epithelial cells probed by traction microscopy. *J Appl Physiol* 2006;101:512-520.

Gaylinn BD, Eddinger TJ, Martino PA, Monical PL, Hunt DF, Murphy RA. Expression of nonmuscle myosin heavy and light chains in smooth muscle. *Am J Physiol* 1989;257:C997-C1004.

Giebel SJ, Menicucci G, McGuire PG, Das A. Matrix metalloproteinases in early diabetic retinopathy and their role in alteration of the blood-retinal barrier. *Lab Invest* 2005;85:597-607.

Goldsack NR, Chambers RC, Dabbagh K, Laurent GJ. Molecules in focus: thrombin. *Int J Biochem Cell Biol* 1998;30:641-646.

Goley ED, Welch MD. The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7:713-726.

Gómez J, García A, Borlado LR, Bonay P, Martínez-A C, Silva A, Fresno M, Carrera AC, Eicher-Streiber C, Rebollo A. IL-2 signaling controls actin organization through Rho-like protein family, phosphatidylinositol 3-kinase, and protein kinase C-zeta. *J Immunol* 1997;158:1516-1522.

Gong MC, Fuglsang A, Alessi D, Kobayashi S, Cohen P, Somlyo AV, Somlyo AP. Arachidonic acid inhibits myosin light chain phosphatase and sensitizes smooth muscle to calcium. *J Biol Chem* 1992;267:21492-21498.

Gschwendt M, Müller HJ, Kielbassa K, et al. Rottlerin, a novel protein kinase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;199:93-98.

Hall A. Rho GTPases and the control of cell behaviour. *Biochem Soc Trans* 2005;33:891-895.

Harhaj NS, Antonetti DA. Regulation of tight junctions and loss of barrier function in pathophysiology. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:1206-1237.

Hartshorne DJ. Myosin phosphatase: subunits and interactions. *Acta Physiol Scand* 1998;164:483-493.

Hartzell HC, Qu Z, Yu K, Xiao Q, Chien LT. Molecular physiology of bestrophins: multifunctional membrane proteins linked to Best disease and other retinopathies. *Physiol Rev* 2008;88:639-672.

Hirai T, Chida K. Protein kinase C $\zeta$  (PKC $\zeta$ ): activation mechanisms and cellular functions. *J Biochem* 2003;133:1-7.

Hirano K, Derkach DN, Hirano M, Nishimura J, Kanaide H. Protein kinase network in the regulation of phosphorylation and dephosphorylation of smooth muscle myosin light chain. *Mol Cell Biochem* 2003;248:105-114.

Hirose M, Ishizaki T, Watanabe N, Uehata M, Kranenburg O, Moolenaar WH, Matsumura F, Maekawa M, Bito H, Narumiya S. Molecular dissection of the Rho-associated protein kinase (p160ROCK)-regulated neurite remodeling in neuroblastoma N1E-115 cells. *J Cell Biol* 1998;141:1625-1636.

Holinstat M, Mehta D, Kozasa T, Minshall RD, Malik AB. Protein kinase C $\alpha$ -induced p115RhoGEF phosphorylation signals endothelial cytoskeletal rearrangement. *J Biol Chem* 2003;278:28793-28798.

Hollborn M, Petto C, Steffen A, et al. Effects of thrombin on RPE cells are mediated by transactivation of growth factor receptors. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 2009;50:4452-4459.

Hollenberg, MD. Proteinase-mediated signaling: Proteinase-activated receptors (PARs) and much more. *Life Sciences* 2003;74:237-246.

Holtkamp GM, de Vos AF, Peek R, Kijlsta A. Analysis of the secretion pattern of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and transforming growth factor-beta 2 (TGF- $\beta$ 2) by human retinal pigment epithelial cells. *Clin Exp Immunol* 1999;118:35-40.

Hsieh HL, Tung WH, Wu CY, Wang HH, Lin CC, Wang TS, Yang CM. Thrombin induces EGF receptor expression and cell proliferation via a PKC( $\delta$ )/c-Src-dependent pathway in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29:1594-1601.

Huang J, Mahavadi S, Sriwai W, Hu W, Murthy KS. G<sub>i</sub>-coupled receptors mediate phosphorylation of CPI-17 and MLC<sub>20</sub> via preferential activation of the PI3K/ILK pathway. *Biochem J* 2006;396:193-200.

Ikebe M. Regulation of the function of mammalian myosin and its conformational change. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;369:157-164.

Ishida K, Panjwani N, Cao Z, Streilein JW. Participation of pigment epithelium in ocular immune privilege. 3. Epithelia cultured from iris, ciliary body, and retina suppress T-cell activation by partially non-overlapping mechanisms. *Ocul Immunol Inflamm* 2003;11:91-105.

Ishizaki T, Maekawa M, Fujisawa K, Okawa K, Iwamatsu A, Fujita A, Watanabe N, Saito Y, Kakizuka A, Morii N, Narumiya S. The small GTP-binding protein Rho binds to and activates a 160 kDa Ser/Thr protein kinase homologous to myotonic dystrophy kinase. *EMBO J* 1996;15:1885-1893.

Ito M, Nakano T, Erdódi F, Hartshorne DJ. Myosin phosphatase: structure, regulation and function. *Mol Cell Biochem* 2004;259:197-209.

Itoh K, Hara T, Yamada F, Shibata N. Diphosphorylation of platelet myosin ex vivo in the initial phase of activation by thrombin. *Biochim Biophys Acta* 1992;1136:52-56.

Iwabu A, Smith K, Allen FD, Lauffenburger DA, Wells A. Epidermal growth factor induces fibroblast contractility and motility via a protein kinase C  $\delta$ -dependent pathway. *J Biol Chem* 2004;279:14551-14560.

Jin H, Sperka T, Herrlich P, Morrison H. Tumorigenic transformation by CPI-17 through inhibition of a merlin phosphatase. *Nature* 2006;442:576-579.

Jin Y, Blue EK, Dixon S, Hou L, Wysolmerski RB, Gallagher PJ. Identification of a new form of death-associated protein kinase that promotes cell survival. *J Biol Chem* 2001;276:39667-39678.

Kajimoto T, Sawamura S, Tohyama Y, Mori Y, Newton AC. Protein kinase C  $\delta$ -specific activity reporter reveals agonist-evoked nuclear activity controlled by Src family of kinases. *J Biol Chem* 2010;285:41896-41910.

Kamm KE, Stull JT. Dedicated myosin light chain kinases with diverse cellular functions. *J Biol Chem* 2001;276:4527-4530.

Kanchanawong P, Shtengel G, Pasapera AM, Ramko EB, Davidson MW, Hess HF, Waterman CM. Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions. *Nature* 2010;468:580-584.

Kandabashi T, Shimokawa H, Miyata K, Kunihiro I, Kawano Y, Fukata Y, Higo T, Egashira K, Takahashi S, Kaibuchi K, Takeshita A. Inhibition of myosin phosphatase by upregulated Rho-kinase plays a key role for coronary artery spasm in a porcine model with interleukin-1 $\beta$ . *Circulation* 2000;101:1319-1323.

Kandel ER, Schawrtz JH, Jessell TM. *Principles of Neural Science*. McGraw-Hill; New York: 2000. p. 507-522.

Kim JH, Kim JH, Jun HO, Yu YS, Kim KW. Inhibition of protein kinase C  $\delta$  attenuates blood-retinal barrier breakdown in diabetic retinopathy. *Am J Pathol* 2010;176:1517-1524.

Kim YH, Kim YS, Kang SS, Noh HS, Kim HJ, Cho GJ, Choi WS. Expression of 14-3-3  $\zeta$  and interaction with protein kinase C in the rat retina in early diabetes. *Diabetologia* 2005;48:1411-1415.

Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara K, Fukata Y, Nakafuku M, Yamamori B, Feng J, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* 1996;273:245-248.

Kirchhof B. Strategies to influence PVR development. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 2004;42:699-703.

Kiss E, Murányi A, Csontos C, Gergely P, Ito M, Hartshorne DJ, Erdődi F. Integrin-linked kinase phosphorylates the myosin phosphatase target subunit at the inhibitory site in platelet cytoskeleton. *Biochem J* 2002;365:79-87.



Kitazawa T, Eto M, Woodsome TP, Brautigam DL. Agonists trigger G protein-mediated activation of the CPI-17 inhibitor phosphoprotein of myosin light chain phosphatase to enhance vascular smooth muscle contractility. *J Biol Chem* 2000;275:9897-9900.

Kitazawa T, Takizawa N, Ikebe M, Eto M. Reconstitution of protein kinase C-induced contractile  $Ca^{2+}$  sensitization in Triton X-100-demembrated rabbit arterial smooth muscle. *Journal of Physiology* 1999;520.1:139-152.

Knezevic N, Roy A, Timblin B, Konstantoulaki M, Sharma T, Malik AB, Mehta D. GDI-1 phosphorylation switch at Serine 96 induces RhoA activation and increased endothelial permeability. *Mol Cell Biol* 2007;27:6323-6333.

Kolosova IA, Ma SF, Adyshev DM, Wang P, Ohba M, Natarajan V, Garcia JGN, Verin AD. Role of CPI-17 in the regulation of endothelial cytoskeleton. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;287:L970-L980.

Komatsu S, Ikebe M. ZIP kinase is responsible for the phosphorylation of myosin II and necessary for cell motility in mammalian fibroblasts. *J Cell Biol* 2004;165:243-254.

Koyama M, Ito M, Feng J, Seko T, Shiraki K, Takase K, Hartshorne DJ, Nakano T. Phosphorylation of CPI-17, an inhibitory phosphoprotein of smooth muscle myosin phosphatase, by Rho-kinase. *FEBS Lett* 2000;475:197-200.

Kuwahara K, Saito Y, Nakagawa O, Kishimoto I, Harada M, Ogawa E, Miyamoto Y, Hamanaka I, Kajiyama N, Takahashi N, Izumi T, Kawakami R, Tamura N, Ogawa Y, Nakao K. The effects of the selective ROCK inhibitor, Y27632, on ET-1-induced hypertrophic response in neonatal rat cardiac myocytes – possible involvement of Rho/ROCK pathway in cardiac muscle cell hypertrophy. *FEBS Lett* 1999;452:314-318.

Landsverk ML, Epstein HF. Genetic analysis of myosin II assembly and organization in model organisms. *Cell Mol Life Sci* 2005;62:2270-2282.

Larsson C. Protein kinase C and the regulation of the actin cytoskeleton. *Cell Signal* 2006;18:276-284.

Laudanna C, Mochly-Rosen D, Liron T, Constantin G, Butcher EC. Evidence of z protein kinase C involvement in polymorphonuclear neutrophil integrin-dependent adhesion and chemotaxis. *J Biol Chem* 1998;273:30306-30315.

Lee JH, Koh H, Kim M, Kim Y, Lee SY, Karess RE, Lee SH, Shong M, Kim JM, Kim J, Chung J. Energy-dependent regulation of cell structure by AMP-activated protein kinase. *Nature* 2007;447:1017-1021.

Lenz S, Lohse P, Seidel U, Arnold HH. The alkali light chains of human smooth and nonmuscle myosins are encoded by a single gene. *J Biol Chem* 1989;264:9009-9015.

Leung T, Chen XQ, Manser E, Lim L. The p160 RhoA-binding kinase ROK $\alpha$  is a member of a kinase family and is involved in the reorganization of the cytoskeleton. *Mol Cell Biol* 1996;16:5313-5327.

Leung T, Chen XQ, Tan I, Manser E, Lim L. Myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase acts as a Cdc42 effector in promoting cytoskeletal reorganization. *Mol Cell Biol* 1998;18:130-140.

Li C, Wernig F, Leitges M, Hu Y, Xu Q. Mechanical stress-activated PKC $\delta$  regulates smooth muscle cell migration. *FASEB J* 2003;17:2106-8.

Li X, Hahn CN, Parsons M, Drew J, Vadas MA, Gamble JR. Role of protein kinase C $\zeta$  in thrombin-induced endothelial permeability changes: inhibition by angiopoietin-1. *Blood* 2004;104:1716-1724.

Liedtke CM, Hubbard M, Wang X. Stability of actin cytoskeleton and PKC- $\delta$  binding to actin regulate NKCC1 function in airway epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003;284:C487-C496.

Liu QR, Zhang PW, Zhen Q, Walther D, Wang XB, Uhl GR. KEPI, a PKC-dependent protein phosphatase 1 inhibitor regulated by morphine. *J Biol Chem* 2002;277:13312-13320.

Liu QR, Zhang PW, Lin Z, Li QF, Woods AS, Troncoso J, Uhl GR. GBPI, a novel gastrointestinal- and brain-specific PP1-inhibitory protein, is activated by PKC and inactivated by PKA. *Biochem J* 2004;377:171-181.

Lowey S, Trybus KM. Common structural motifs for the regulation of divergent class II myosins. *J Biol Chem* 2010;285:16403-16407.

MacDonald JA, Borman MA, Murányi A, Somlyo AV, Hartshorne DJ, Haystead TAJ. Identification of the endogenous smooth muscle myosin phosphatase-associated kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:2419-2424.

Macfarlane SR, Seatter MJ, Kanke T, Hunter GD, Plevin R. Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev* 2001;53:245-282.

Majumdar M, Seasholtz TM, Buckmaster C, Tokzos D, Heller-Brown J. A Rho exchange factor mediates thrombin and G $\alpha_{12}$ -induced cytoskeletal responses. *J Biol Chem* 1999;274:26815-26821.

Marmor MF. Structure, function, and disease of the retinal pigment epithelium. En: The Retinal Pigment Epithelium. Eds.: Marmor MF, Wolfensberger TJ. Oxford University Press; New York: 1998. p. 3-9.

Massoumi R, Larsson C, Sjölander A. Leukotriene D4 induces stress-fibre formation in intestinal epithelial cells via activation of RhoA and PKC $\delta$ . J Cell Sci 2002;115:3509-3515.

Matsumura F. Regulation of myosin II during cytokinesis in higher eukaryotes. Trends Cell Biol 2005;15:371-377.

Mehta D, Rahman A, Malik AB. Protein kinase C- $\alpha$  signals Rho-guanine nucleotide dissociation inhibitor phosphorylation and Rho activation and regulates the endothelial cell barrier function. J Biol Chem 2001;276:22614-22620.

Minshall RD, Vandenbroucke EE, Holinstat M, Place AT, Tiruppathi C, Vogel SM, van Nieuw Amerongen GP, Mehta D, Malik AB. Role of protein kinase C $\zeta$  in thrombin-induced RhoA activation and inter-endothelial gap formation of human dermal microvessel endothelial cell monolayers. Microvasc Res 2010;80:240-249.

Miura M, Hata Y, Hirayama K, Kita T, Noda Y, Fujisawa K, Shimokawa H, Ishibashi T. Critical role of the Rho-kinase pathway in TGF- $\beta$ 2-dependent collagen gel contraction by retinal pigment epithelial cells. Exp Eye Res 2006;82:849-859.

Miyamoto N, de Kozak Y, Jeanny JC, Glotin A, Mascarelli F, Massin P, BenEzra D, Behar-Cohen F. Placental growth factor-1 and epithelial haemato-retinal barrier breakdown: potential implication in the pathogenesis of diabetic retinopathy. Diabetologia 2007;50:461-470.

Morano I. Tuning smooth muscle contraction by molecular motors. J Mol Med 2003;81:481-487.

Moustakas A, Heldin CH. Non-Smad TGF- $\beta$  signals. J Cell Sci 2005;118:3573-3584.

Mueller BK, Mack H, Teusch N. Rho kinase, a promising drug target for neurological disorders. Nat Rev Drug Discovery 2005;4:387-398.

Mukai Y, Shimokawa H, Matoba T, Kandabashi T, Satoh S, Hiroki J, Kaibuchi K, Takeshita A. Involvement of Rho-kinase in hypertensive vascular disease – a novel therapeutic target in hypertension. FASEB J 2001;15:1062-1064.

Mundell SJ, Jones ML, Hardy AR, Barton JF, Beaucourt SM, Conley PB, Poole AW. Distinct roles for protein kinase C isoforms in regulating platelet purinergic receptor function. Mol Pharmacol 2006;70:1132-1142.

Murányi A, Zhang R, Liu F, Hirano K, Ito M, Epstein HF, Hartshorne DJ. Myotonic dystrophy protein kinase phosphorylates the myosin phosphatase targeting subunit and inhibits myosin phosphatase activity. *FEBS Lett* 2001;493:80-84.

Murányi A, Derkach D, Erdődi F, Kiss A, Ito M, Hartshorne DJ. Phosphorylation of Thr695 and Thr850 on the myosin phosphatase target subunit: inhibitory effects and occurrence in A7r5 cells. *FEBS Lett* 2005;579:6611-6615.

Murthy K, Zhou H, Grider JR, Brautigan DL, Eto M, Makhoul GM. Differential signalling by muscarinic receptors in smooth muscle: m2-mediated inactivation of myosin light chain kinase via  $G_{i3}$ , Cdc42/Rac1 and p21-activated kinase 1 pathway, and m3-mediated MLC<sub>20</sub> (20 kDa regulatory light chain of myosin II) phosphorylation via Rho-associated kinase/myosin phosphatase targeting subunit 1 and protein kinase C/CPI-17 pathway. *Biochem J* 2003;374:145-155.

Nagasaki H, Shinagawa K, Mochizuki M. Risk factors for proliferative vitreoretinopathy. *Prog Retinal Eye Res* 1998;17:77-98.

Nakayama M, Amano M, Katsumi A, Kaneko T, Kawabata S, Takefuji M, Kaibuchi K. Rho-kinase and myosin II activities are required for cell type and environment specific migration. *Genes Cells* 2005;10:107-117.

Narumiya S, Tanji M, Ishizaki T. Rho signaling, ROCK and mDia1, in transformation, metastasis and invasion. *Cancer Metastasis Rev* 2009;28:65-76.

Naumanen P, Lappalainen P, Hotulainen P. Mechanisms of actin stress fiber assembly. *J Microsc* 2007;231:446-454.

Newton AC. Protein kinase C: poised to signal. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010;298:E395-E402.

Nguyen QD, Faivre S, Bruyneel E, Rivat C, Seto M, Endo T, Mareel M, Emami S, Gespach C. RhoA- and RhoD-dependent regulatory switch of  $G\alpha$  subunit signaling by PAR-1 receptors in cellular invasion. *FASEB J* 2002;16:565-576.

Niuro N, Ikebe M. Zipper-interacting protein kinase induces a  $Ca^{2+}$ -free smooth muscle contraction via myosin light chain phosphorylation. *J Biol Chem* 2001;276:29567-29574.

Nobe K, Sone T, Paul RJ, Honda K. Thrombin-induced force development in vascular endothelial cells: contribution to alteration of permeability mediated by calcium-dependent and -independent pathways. *J Pharmacol Sci* 2005;99: 252-263.

Noorbakhsh F, Vergnolle N, Hollenberg MD, Power C. Proteinase-activated receptors in the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 2003;4:981-990.

Nowak JZ. Age-related macular degeneration (AMD): pathogenesis and therapy. *Pharmacol Rep* 2006;58:353-363.

Ohama T, Hori M, Sato K, Ozaki H, Karaki H. Chronic treatment with interleukin-1beta attenuates contractions by decreasing the activities of CPI-17 and MYPT-1 in intestinal smooth muscle. *J Biol Chem* 2003;278:48794-48804.

Okada T, Palczewski K. Crystal structure of rhodopsin: implications for vision and beyond. *Curr Opin Struct Biol* 2001;11:420-426.

Otani H, Yoshioka K, Nishikawa H, Inagaki C, Nakamura T. Involvement of protein kinase C and RhoA in protease-activated receptor 1-mediated F-actin reorganization and cell growth in rat cardiomyocytes. *J Pharmacol Sci* 2011;115:135-143.

Ozaki H, Yasuda K, Kim YS, et al. Possible role of the protein kinase C/CPI-17 pathway in the augmented contraction of human myometrium after gestation. *Br J Pharmacol* 2003;140:1303-1312.

Pacheco-Domínguez RL, Palma-Nicolás JP, López E, López-Colomé AM. The activation of MEX-ERK1/2 by glutamate receptor-stimulation is involved in the regulation of RPE proliferation and morphologic transformation. *Exp Eye Res* 2008;86:207-219.

Palma-Nicolas JP, López E, López-Colomé AM. PKC isoenzymes differentially modulate thrombin effect on MAPK-dependent RPE proliferation. *Biosci Rep* 2008;28:307-317.

Palma-Nicolas JP, López E, López-Colomé AM. Thrombin stimulates RPE cell motility by PKC- $\zeta$ - and NF- $\kappa$ B gene expression of MCP-1 and CINC-1/GRO chemokines. *J Cell Biochem* 2010;110:948-959.

Pang H, Guo Z, Su W, Xie Z, Eto M, Gong MC. RhoA-Rho kinase pathway mediates thrombin- and U-46619-induced phosphorylation of a myosin phosphatase inhibitor, CPI-17, in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005;289:C352.C360.

Parrales A, Palma-Nicolás JP, López E, López-Colomé AM. Thrombin stimulates RPE cell proliferation by promoting c-Fos-mediated cyclin D1 expression. *J Cell Physiol* 2010;222:302-312.

Pastor JC, Rodríguez de la Rúa E, Martín F. Proliferative vitreoretinopathy: risk factors and pathobiology. *Prog Retinal Eye Res* 2002;21:127-144.

Paszek M, Zahir N, Johnson KR, Lakins JN, Rozenberg GI, Gefen A, Reinhart-King CA, Margulies SS, Dembo M, Boettiger D, Hammer DA, Weaver VM. Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell* 2005;8:241-254.

Patil SB, Bitar KN. RhoA- and PKC- $\alpha$ -mediated phosphorylation of MYPT and its association with HSP27 in colonic smooth muscle cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;290:G83-G95.

Pellegrin S, Mellor H. Actin stress fibres. *J Cell Sci* 2007;120:3491-3499.

Poole DP, Furness JB. PKC  $\delta$ -isoform translocation and enhancement of tonic contractions of gastrointestinal smooth muscle. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007;292:G887-G898.

Ramachandran C, Patil RV, Combrink K, Sharif NA, Srinivas SP. Rho-Rho kinase pathway in the actomyosin contraction and cell-matrix adhesion in immortalized human trabecular meshwork cells. *Mol Vision* 2011;17:1877-1890.

Ramachandran R, Hollenberg MD. Proteinases and signalling: pathophysiological and therapeutic implications via PARs and more. *Br J Pharmacol* 2008;153:S263-S282.

Raymond MC, Thompson JT. RPE-mediated collagen gel contraction. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 1990;31:1079-1086.

Rehak M, Hollborn M, Iandiev I, Pannicke T, Karl A, Wurm A, Kohen L, Reichenbach A, Wiedemann P, Bringmann A. Retinal gene expression and Müller cell responses after branch retinal vein occlusion in the rat. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 2009;50:2359-2367.

Ren XD, Wang R, Li Q, Kahek LA, Kaibuchi K, Clark RA. Disruption of Rho signal transduction upon cell detachment. *J Cell Sci* 2004;117:3511-3518.

Revenu C, Athman R, Robine S, Louvard D. The co-workers of actin filaments: from cell structures to signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004;5:1-12.

Riento K, Ridley A. Rocks: multifunctional kinases in cell behavior. *Nat Rev Mol Cell* 2003;4:446-456.

Runkle EA, Antonetti DA. The blood-retinal barrier: structure and functional significance. En: The Blood-Brain and Other Neural Barriers: Reviews and Protocols, Methods in Molecular Biology. Ed.: Nag S. Humana Press; New York: 2011. p. 133-148.

Russo JM, Florian P, Shen L, Graham WV, Tretiakova MS, Gitter AH, Mrsny RJ, Turner JR. Distinct temporal-spatial roles for Rho-kinase and myosin light chain kinase in epithelial purse-string wound closure. *Gastroenterology* 2005;128:987-1001.

Sah VP, Seasholtz TM, Sagi SA, Heller-Brown J. The role of Rho in G protein-coupled receptor signal transduction. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2000;40:459-489.

Sahai E, Marshall CJ. Differing modes of tumor cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nat Cell Biol* 2003;5:711-719.

Saika S, Yamanaka O, Flanders KC, Okada Y, Miyamoto T, Sumioka T, Shirai K, Kitano A, Miyazaki K, Tanaka S, Ikeda K. Epithelial-mesenchymal transition as a therapeutic target for prevention of ocular tissue fibrosis. *Endocr, Metab Immune Disord: Drug Targets* 2008;8:69-76.

Saitoh M, Ishikawa T, Matsushima S, Naka M, Hidaka H. Selective inhibition of catalytic activity of smooth muscle myosin light chain kinase. *J Biol Chem* 1987;262:7796-7801.

Sakamoto T, Sakamoto H, Sheu SJ, Gabrielian K, Ryan SJ, Hinton DR. Intercellular gap formation induced by thrombin in confluent cultured bovine retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Visual Sic* 1994;35:720-729.

Sandoval R, Malik AB, Minshall RD, Kouklis P, Ellis CA, Tiruppathi C.  $Ca^{2+}$  signalling and PKC $\alpha$  activate increased endothelial permeability by disassembly of VE-cadherin junctions. *J Physiol* 2001;533:433-445.

Schaafsma D, Bos IST, Zuidhof AB, Zaagsma J, Meurs H. Inhalation of the Rho-kinase inhibitor Y-27632 reverses allergen-induced airway hyperresponsiveness after the early and late asthmatic reaction. *Respir Res* 2006;7:121.

Schmidt A, Hall MN. Signaling to the actin cytoskeleton. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1998;14:305-338.

Sellers JR. Myosins: a diverse superfamily. *Biochim Biophys Acta, Mol Cell Res* 2000;1496:3-22.

Siehler S. Regulation of RhoGEF proteins by  $G_{12/13}$ -receptors. *Br J Pharmacol* 2009;158:41-49.

Siflinger-Birnboim A, Johnson A. Protein kinase C modulates pulmonary endothelial permeability: a paradigm for acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;284:L435-L451.

Simó R, Villarroel M, Corraliza L, Hernández C, Garcia-Ramírez M. The retinal pigment epithelium: something more than a constituent of the blood-retinal barrier – Implications for the pathogenesis of diabetic retinopathy. *J Biomed Biotechnol* 2010;2010:190724.

Singh I, Knezevic N, Ahmmed, GU, Kini V, Malik AB, Mehta D.  $G\alpha_q$ -TRPC6-mediated  $Ca^{2+}$  entry induces RhoA activation and resultant endothelial cell shape change in response to thrombin. *J Biol Chem* 2007;282:7833-7843.

Soh UJK, Dores MR, Chen B, Trejo J. Signal transduction by protease-activated receptors. *Br J Pharmacol* 2010;160:191-203.

Soltoff SP. Rottlerin: an inappropriate and ineffective inhibitor of PKC $\delta$ . *Trends Pharmacol Sci* 2007;28:453-458.

Somlyo AP, Somlyo AV.  $Ca^{2+}$  sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases and myosin phosphatase. *Physiol Rev* 2003;83:1325-1358.

Spaide RF, Yannuzzi LA. Manifestations and pathophysiology of serous detachment of the retinal pigment epithelium and retina. En: *The Retinal Pigment Epithelium*. Eds.: Marmor MF, Wolfensberg TJ. Oxford University Press; New York: 1998. p. 439-455.

Sparrow JR, Hicks D, Hamel CP. The retinal pigment epithelium in health and disease. *Curr Mol Med* 2010;10:802-823.

Srinivas SP, Satpathy M, Guo Y, Anandan V. Histamine-induced phosphorylation of the regulatory light chain of myosin II disrupts the barrier integrity of corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 2006;47:4011-4018.

Steinberg SF. Structural basis of protein kinase C isoform function. *Physiol Rev* 2008;88:1341-1378.

Steinhoff M, Buddenkotte J, Shpacovitch V, Rattenholl A, Moormann C, Vergnolle N, Luger TA, Hollenberg MD. Proteinase-activated receptors: transducers of proteinase-mediated signaling in inflammation and immune response. *Endocr Rev* 2005;26:1-43.

Strauss O. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev* 2005;85:845-881.



Strick DJ, Feng W, Vollrath D. Merck drives myosin II redistribution during retinal pigment epithelial phagocytosis. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 2009;50:2427-2435.

Swaroop A, Kim D, Forrester D. Transcriptional regulation of photoreceptor development and homeostasis in the mammalian retina. *Nat Rev Neurosci* 2010;11:563-576.

Takizawa N, Koga Y, Ikebe M. Phosphorylation of CPI17 and myosin binding subunit of type 1 protein phosphatase by p21-activated kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;297:773-778.

Tanaka KA, Levy JH. Regulation of thrombin activity – pharmacologic and structural aspects. *Hematol Oncol Clin N Am* 2007;21:33-50.

Terrak M, Kerff F, Langsetmo K, Tao T, Dominguez R. Structural basis of protein phosphatase 1 regulation. *Nature* 2004;429:780-784.

Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr Opin Cell Biol* 2003;15:740-746.

Thompson DA, Gal A. Vitamin A metabolism in the retinal pigment epithelium: genes, mutations, and diseases. *Prog Retinal Eye Res* 2003;22:683-703.

Tóth A, Kiss E, Gergely P, Walsh MP, Hartshorne DJ, Erdődi F. Phosphorylation of MYPT1 by protein kinase C attenuates interaction with PP1 catalytic subunit and the 20 kDa light chain of myosin. *FEBS Lett* 2000;484:113-117.

Totsukawa G, Wu Y, Sasaki Y, Hartshorne DJ, Yamakita Y, Yamashiro S, Matsumura F. Distinct roles of MLCK and ROCK in the regulation of membrane protrusions and focal adhesion dynamics during cell migration. *J Cell Biol* 2004;164:427-439.

Turner JR. Molecular basis of epithelial barrier regulation. *Am J Pathol* 2006;169:1901-1909.

Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, Ono T, Kawahara T, Morishita T, Tamakawa H, Yamagami K, Inui J, Maekawa M, Narumiya S. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature* 1997;389:990-994.

Usui Y, Okunuki Y, Hattori T, Kezuka T, Keino H, Ebihara N, Sugita S, Usui M, Goto H, Takeuchi M. Functional expression of B7H1 on retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res* 2008;86:52-59.

Velasco G, Armstrong C, Morrice N, Frame S, Cohen P. Phosphorylation of the regulatory subunit of smooth muscle protein phosphatase 1M at Thr850 induces its dissociation from myosin. *FEBS Lett* 2002;527:101-104.

Vicente-Manzanares M, Ma X, Adelstein RS, Horwitz AR. Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;10:778-790.

Vijayalakshmi T, Menon M, Thamilselvan S. Oxalate-induced activation of PKC- $\alpha$  and  $\delta$  regulates NADPH oxidase-mediated oxidative injury in renal tubular epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009;297:F1399-F1410.

Wadgaonkar R, Nurmukhambetova S, Zaiman AL, Garcia JG Mutation analysis of the non-muscle myosin light chain kinase (MLCK) deletion constructs on CV1 fibroblast contractile activity and proliferation. *J Cell Biochem* 2003;88:623-634.

Wallace VA. Making a retina – from the building blocks to clinical applications. *Stem Cells* 2011;29:412-417.

Watanabe Y, Ito M, Kataoka Y, Wada H, Koyama M, Feng J, Shiku H, Nishikawa M. Protein kinase C-catalyzed phosphorylation of an inhibitory phosphoprotein of myosin phosphatase is involved in human platelet secretion. *Blood* 2001;97:3798-3805.

Weiss A, Leinwand LA. The mammalian myosin heavy chain gene family. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1996;12:417-439.

Wennerberg K, Der CJ. Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *J Cell Sci* 2004;117:1301-1312.

Wettschureck N, Offermanns S. Rho/Rho-kinase mediated signaling in physiology and pathophysiology. *J Mol Med (Berl)* 2002;80:629-638.

Wilkinson S, Paterson HF, Marshall CJ. Cdc42-MRCK and Rho-ROCK signalling cooperate in myosin phosphorylation and cell invasion. *Nat Cell Biol* 2005;7:255-261.

Wilkinson SE, Parker PJ, Nixon JS. Isoenzyme specificity of bisindolylmaleimides, selective inhibitors of protein kinase C. *Biochem J* 1993;294:335-337.

Wimmers S, Karl MO, Strauss O. Ion channels in the RPE. *Prog Retinal Eye Res* 2007;26:263-301.

Witmer AN, Vrensen GFJM, van Noorden CJF, Schlingemann RO. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis in eye disease. *Prog Retinal Eye Res* 2003;22:1-29.

Wójciak-Stothard B, Potempa S, Eichholtz T, Ridley AJ. Rho and Rac but not Cdc42 regulate endothelial cell permeability. *J Cell Sci* 2001;114:1343-1355.

Wolfensberger TJ. The historical discovery of the retinal pigment epithelium. En: *The Retinal Pigment Epithelium*. Eds.: Marmor MF, Wolfensberger TJ. Oxford University Press; New York: 1998. p. 13-22.

Wood JPM, Osborne NN. Expression of protein kinase C isoenzymes in cultured hooded rat retinal pigmented epithelial cells: comparison with dystrophic royal college surgeons rat. *Curr Eye Res* 1998;17:757-760.

Woodsome TP, Eto M, Everett A, Brautigan DL, Kitazawa T. Expression of CPI-17 and myosin phosphatase correlates with  $Ca^{2+}$  sensitivity of protein kinase C-induced contraction in rabbit smooth muscle. *J Physiol* 2001;535.2:553-564.

Wyckoff JB, Pinner SE, Gschmeissner S, Condeelis JS, Sahai E. ROCK- and myosin-dependent matrix deformation enables protease-independent tumor-cell invasion in vivo. *Curr Biol* 2006;16:1515-1523.

Wylie SR, Chantler PD. Myosin IIA drives neurite retraction. *Mol Biol Cell* 2003;14:4654-4666.

Yamamoto M, Ramirez SH, Sato S, Kiyota T, Cerny RL, Kaibuchi K, Persidsky Y, Ikezu T. Phosphorylation of claudin-5 and occludin by Rho kinase in brain endothelial cells. *Am J Pathol* 2008;172:521-533.

Yamashiro S, Totsukawa G, Yamakita Y, Sasaki Y, Madaule P, Ishizaki T, Narumiya S, Matsumura F. Citron kinase, a Rho-dependent kinase, induces di-phosphorylation of regulatory light chain of myosin II. *Mol Biol Cell* 2003;14:1745-1756.

Yamazaki J, Katoh H, Negishi M. Lysophosphatidic acid and thrombin receptors require both G  $\alpha_{12}$  and G  $\alpha_{13}$  to regulate axonal morphology in hippocampal neurons. *Biol Pharm Bull* 2008; 31:2216-2222.

Yoshida A, Elnér SG, Bian ZM, Kunkel SL, Lukacs NW, Elnér VM. Thrombin regulates chemokine induction during human retinal pigment epithelial cell/monocyte interaction. *Am J Pathol* 2001;159:1171-1180.

Yu K, Ma P, Ge J, Willey CD, Yang P, Wang Z, Gao Q. Expression of protein kinase C isoforms in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 2007;245:993-999.

Zamiri P, Masli S, Streilein JW, Taylor AW. Pigment epithelial growth factor suppresses inflammation by modulating macrophage activation. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 2006;47:3912-3918.

Zemlickova E, Johannes FJ, Aitken A, Dubois T. Association of CPI-17 with protein kinase C and casein kinase I. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;316:39-47.

Zhou Y, Hirano K, Sakihara C, Nishimura J, Kanaide H. NH<sub>2</sub>-terminal fragments of the 130 kDa subunit of myosin phosphatase increases the Ca<sup>2+</sup> sensitivity of porcine renal artery. *J Physiol* 1999a;516:55-65.

Zhou Y, Nishimura J, Hirano K, Kanaide H. The exogenously added small subunit of smooth muscle myosin phosphatase increases the Ca<sup>2+</sup> sensitivity of the contractile apparatus in the permeabilized porcine renal artery. *Biochem Biophys Res Commun* 1999b;254:158-163.

# Thrombin Promotes Actin Stress Fiber Formation in RPE Through Rho/ROCK-Mediated MLC Phosphorylation

ARIADNA YOLANDA RUIZ-LOREDO, EDITH LÓPEZ, AND ANA MARÍA LÓPEZ-COLOMÉ\*

*División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., Mexico*

The retinal pigment epithelium (RPE) forms the outer blood–retina barrier (BRB). Most retinal diseases involve BRB breakdown, whereupon thrombin contained in serum directly contacts the RPE. Thrombin is known to promote actin stress fiber formation, an important determinant in eye diseases involving the epithelial–mesenchymal transition (EMT) and migration of RPE cells, such as proliferative vitreoretinopathy. We analyzed thrombin effect on signaling pathways leading to myosin light chain (MLC) phosphorylation and actin stress fiber formation in primary cultures of rat RPE cells, in order to support a role for thrombin in RPE transdifferentiation. MLC phosphorylation was measured by Western blot; actin cytoskeleton was visualized using immunofluorescent phalloidin, and Rho GTPase activation was assessed by ELISA. We showed that thrombin/PAR-1 induces the time- and dose-dependent phosphorylation of MLC through the activation of Rho/ROCK and myosin light chain kinase (MLCK). ROCK increased phospho-MLC by phosphorylating MLC and by inhibiting MLC phosphatase. Thrombin effect was abolished by the ROCK inhibitor Y-27632, whereas MLCK inhibitor ML-7 and PLC- $\beta$  inhibitor U73122 attenuated MLC phosphorylation by  $\approx 50\%$ , suggesting the activation of MLCK by PLC- $\beta$ -mediated calcium increase. Additionally, thrombin-induced MLC phosphorylation was blocked by the inhibitory PKC $\zeta$  pseudosubstrate, wortmannin, and LY294002, indicating IP $_3$ /PKC $\zeta$  involvement in the control of MLC phosphorylation. Moreover, we demonstrated that thrombin effect on MLC induces actin stress fiber formation, since this effect was prevented by inhibiting the pathways leading to MLC phosphorylation. We conclude that thrombin stimulation of MLC phosphorylation and actin stress fiber formation may be involved in thrombin-induced RPE cell transformation subsequent to BRB dysfunction.

J. Cell. Physiol. 226: 414–423, 2011. © 2010 Wiley-Liss, Inc.

The retinal pigment epithelium (RPE), located between the neural retina and the choriocapillaries, plays an essential role in the maintenance of visual function. Among its functions, RPE cell monolayer forms the outer blood–retina barrier (BRB), which prevents the access of blood cells and plasma proteins to the retina, and regulates the movement of ions and solutes (Strauss, 2005).

The breakdown of the BRB has particularly grievous consequences to vision, since increased permeability of the BRB is an early event in the establishment of most retinal diseases, such as subretinal neovascularization, diabetic retinopathy, and proliferative vitreoretinopathy (PVR) (Sakamoto et al., 1994; Pastor et al., 2002). The barrier integrity of cellular monolayers is directly related to the actin cytoskeleton, as has been shown by studies demonstrating an increase in the paracellular permeability by actin-disrupting agents (Harhaj and Antonetti, 2004). Cellular contraction generated by the interaction of actin with its motor protein, myosin II, has also been shown to compromise the barrier function in endothelial (Birukova et al., 2004) and epithelial (Zolotarevsky et al., 2002; Hayashi et al., 2006) cells.

As a consequence of BRB breakdown RPE cells are exposed to a variety of components contained in serum including thrombin, a multifunctional serine protease activated upon tissue injury. In addition to its role in hemostasis, thrombin has been shown to promote distinct cellular responses such as extracellular matrix turnover, prostaglandin synthesis, vasoconstriction, release of cytokines, chemotaxis, and proliferation (MacFarlane et al., 2001).

Thrombin intracellular signaling is mediated by G protein-coupled receptors (GPCRs) termed proteinase-activated receptors (PARs), activated by the proteolytic unmasking of a new N-terminal sequence that functions as a tethered ligand which binds intramolecularly to the receptor. Four types of PARs are currently known: PAR-1, -3, and -4, activated by

thrombin, and PAR-2, activated by trypsin, tryptase, and other serine proteases (Coughlin, 2000). PARs can also be activated by short synthetic peptides mimicking the amino terminus created by cleavage (MacFarlane et al., 2001). PAR-1, the prototype of this family, couples to members of the G $_{q/11}$ , G $_i$ , and G $_{12/13}$  families of GPCRs. G $_{\alpha q}$  subunits activate phospholipase C $\beta$  (PLC- $\beta$ ), with the formation of inositol 1,4,5-trisphosphate (IP $_3$ ) and diacylglycerol (DAG), the endogenous activator of conventional/novel PKC isoforms. G $_{\alpha i}$  inhibits adenylyl cyclase, while the G $_{\beta\gamma}$  subunits can activate phosphoinositide 3-kinase (PI3K) and other lipid modifying enzymes, protein kinases and ion channels. Finally, the  $\alpha$ -subunits of G $_{12}$  and G $_{13}$  activate Rho GTPases, known to be involved in the regulation of the assembly and organization of the actin cytoskeleton (Coughlin, 2000; MacFarlane et al., 2001).

The most extensively characterized members of the Rho family of GTPases are Rho, Rac, and Cdc42. Whereas Rac and Cdc42 control the polymerization of actin to form peripheral

Contract grant sponsor: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología;

Contract grant number: CB-80398.

Contract grant sponsor: Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica/UNAM;

Contract grant number: IN200209.

\*Correspondence to: Ana María López-Colomé, Apartado Postal 70-253, Ciudad Universitaria, C.P. 04510, México, D.F., Mexico. E-mail: acolome@ifc.unam.mx

Received 11 March 2010; Accepted 15 July 2010

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com), 29 July 2010.

DOI: 10.1002/jcp.22347

lamellipodial and filopodial protrusions, respectively (Sah et al., 2000; Etienne-Manneville and Hall, 2002), the RhoA, B, and C small GTP-binding proteins have been implicated in the modulation of the F-actin cytoskeleton and cell shape, by regulating the assembly of contractile acto-myosin filaments (Ridley and Hall, 1992). Rho substrates that include PI3K, P15-kinase, mDia, and ROCK modulate the F-actin cytoskeleton (Chong et al., 1994; Maekawa et al., 1999). Among these targets, activated ROCK regulates the formation of F-actin fibers both by promotion of actin polymerization and the prevention of actin depolymerization (Maekawa et al., 1999).

Acto-myosin driven contraction is initiated by the phosphorylation of regulatory myosin light chains (MLCs) at Ser-19 and Thr-18 by a network of kinases, including the  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent myosin light chain kinase (MLCK) and the serine/threonine-directed Rho kinase/ROK $\alpha$ /ROCK-II and p160ROCK/ROCK $\beta$  kinases, generically referred to as ROCK (Sah et al., 2000; Clark et al., 2007). MLC phosphorylation initiates myosin  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase activity, causing the binding of myosin to F-actin and subsequent acto-myosin stress fiber formation (Patterson et al., 1994). The phosphorylation of MLC converts the soluble folded 10S form of non-muscle myosin II to the insoluble unfolded 6S form, which promotes the reorganization of myosin from a diffuse intracellular distribution to its clustering and association with F-actin (Verkhovskiy et al., 1995). The phosphorylation of MLC is also controlled by the myosin light chain phosphatase (MLCP), a trimeric holoenzyme formed by a 38 kDa catalytic subunit (PP1c), a 130 kDa subunit (MYPT1) involved in the targeting of MLCP to myosin filaments, and a 20 kDa small subunit (M20) of unknown function (Ito et al., 2004). Stimuli which activate ROCK and/or protein kinase C (PKC) have been shown to increase MLC phosphorylation through the inactivation of MLCP. Whereas the phosphorylation of MYPT1 by ROCK at Thr-696 and Thr-850 results in the loss of MLCP ability to dephosphorylate MLC, PKC inhibits this phosphatase through the stimulation of the 17 kDa PKC-potentiated inhibitory protein of PP1c (CPI-17) (Hirano et al., 2003). Particularly, thrombin has been shown to inactivate MLC phosphatase (MLCP) via Rho/ROCK in human endothelial cells (Essler et al., 1998).

The activation of Rho GTPases is highly regulated by three classes of proteins: (1) guanine nucleotide exchange factors (GEFs), which catalyze GDP/GTP exchange, mediating activation; (2) GTPase activating proteins (GAPs), which stimulate GTP hydrolysis, leading to inactivation; and (3) guanine nucleotide dissociation inhibitors (GDIs), which target the GTPase to the cytosol in unstimulated cells (Sah et al., 2000).

Considerable evidence indicates that thrombin stimulates Rho and its target protein ROCK in fibroblasts (Sah et al., 2000), epithelial (Gavara et al., 2006) and endothelial (Birukova et al., 2004) cells, promoting the formation of actin stress fibers, focal adhesion complexes, and cellular contraction (Fukata et al., 2001). Actin stress fiber formation and tight junction disassembly of confluent cell monolayers has also been related to PKC activation, although the mechanisms seem to vary according to tissue origin and culture conditions (Harhaj and Antonetti, 2004). These effects are particularly important in endothelia, where thrombin may contribute to barrier dysfunction through the activation of MLCK, ROCK, and PKC by inducing an increase in the phosphorylation of the MLCs (Mehta et al., 2001; Birukova et al., 2004).

Within the eye, thrombin has been involved in the regulation of actin filament formation (Sakamoto et al., 1993), and has also been shown to induce the phosphorylation of the regulatory light chain of myosin II in corneal endothelial cells (Satpathy et al., 2004). In the RPE, thrombin has been shown to stimulate growth factor and chemokine expression (Yoshida et al., 2001;

Hollborn et al., 2009) and the formation of inositol phosphates (Palma-Nicolas et al., 2008), as well as chemotaxis (Hollborn et al., 2009), cell proliferation (Palma-Nicolas et al., 2008), and intercellular gap formation accompanied by the reorganization of cytoskeletal elements (Sakamoto et al., 1994). Interestingly, transforming growth factor  $\beta$ 2 (TGF- $\beta$ 2) promotes MLC phosphorylation in RPE cells by activating a Rho/ROCK-dependent pathway which, additionally, seems to be involved in contractile activity of rabbit RPE cells *in vivo* and *in vitro* (Zheng et al., 2004), suggesting the Rho/ROCK pathway as a therapeutic target for treating fibroproliferative diseases, such as PVR and proliferative diabetic retinopathy (Miura et al., 2006). The possible participation of thrombin in the development of PVR is strengthened by recent work showing that thrombin stimulates RPE cell proliferation, a primary feature in PVR, by activating MAPK ERK1/2, the expression of c-Fos and the transcription of cyclin D1 (Parrales et al., 2010) under the control of PKC $\zeta$  (Palma-Nicolas et al., 2008).

Collectively, these data strongly suggest that thrombin participates in the inflammatory response initiated by BRB breakdown, and its actions may alter RPE function, contributing to the establishment of retinal diseases. This assumption is further supported by recent findings showing that RPE cells may synthesize thrombin from prothrombin via the extrinsic coagulation pathway (Hollborn et al., 2009). In spite of this evidence, the intracellular signaling mechanisms activated by thrombin which result in RPE cell transformation, contraction, and motility remain largely undefined.

In order to support a role for thrombin in RPE cell transformation following BRB disruption we analyzed its effect on the signal transduction pathways leading to MLC phosphorylation and actin stress fiber formation in rat RPE cells in primary culture, as a primary step for cell migration and the establishment of PVR.

## Materials and Methods

### Reagents

All reagents used were cell culture grade. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), trypsin-EDTA and fetal bovine serum (FBS) were purchased from Gibco BRL (Grand Island, NY). Opti-MEM was obtained from Invitrogen (Carlsband, CA); bovine serum albumin (BSA) was from Equitech-Bio, Inc. (Kerrville, TX). Dispase, wortmannin, and phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) were from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). PAR-1 receptor agonist (H-SFLLRNPNDKYEPF-OH), thrombin, hirudin, Ro-32-0432, PKC $\zeta$  pseudosubstrate inhibitor (Myr-SIYRRGARRWRKL), Y-27632 and ML-7 were obtained from Calbiochem (San Diego, CA). U73122 and LY294002 were purchased from Tocris (Ellisville, MO). PAR-3 (H-SFNGGP-NH2) and PAR-4 (H-GYPGKF-NH2) peptide agonists were from Bachem (Torrance, CA). The antibodies for detecting phospho-myosin light chain 2 (Thr18/Ser19), myosin light chain 2, phospho-MYPT1 (Ser668) and MYPT1 were obtained from Cell Signaling (Beverly, MA). Rhodamine-conjugated phalloidin was from Molecular Probes (Eugene, OR). The G-LISA<sup>TM</sup> RhoA activation assay biochem kit was purchased from Cytoskeleton, Inc. (Denver, CO).

### Cell culture

Retinal pigment epithelial cells were isolated as previously described (Pacheco-Domínguez et al., 2008). Briefly, 8- to 10-day-old Long Evans rats were anesthetized by inhaled chloroform and sacrificed following the guidelines for animal care of the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research. The eyes were enucleated, rinsed in DMEM containing penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100  $\mu$ g/ml), and incubated for 30 min at 37°C in medium containing 2% dispase. After removal of the sclera and the choroid, the RPE was detached from the neural

retina in calcium- and magnesium-free Hank's balanced salt solution, and incubated in the presence of 0.1% trypsin-EDTA for 5 min at 37°C. The dissociated cells were suspended in Opti-MEM supplemented with 4% FBS, and seeded at a density of  $2 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> in 8-well chamber slides (Nalge Nunc International, Rochester, NY) for actin staining, and at  $3 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> in 6-well culture plates or in 35 mm  $\times$  10 mm culture dishes (Corning, Inc., Corning, NY) for Western blot analysis and Rho activation assay, respectively. The purity of the culture (99.1%) was established by immunofluorescence against the specific RPE biochemical marker RPE65, as previously described (Parrales et al., 2010), and cell viability (>90%) was assessed by Trypan-blue exclusion.

All experiments were performed in confluent RPE cell monolayers. Cells were serum-deprived for 24 h, and incubated in the presence of 2 U/ml thrombin or specific PAR agonists (25  $\mu$ M) for the indicated period of time, unless otherwise specified. When tested, pharmacological inhibitors were included 30 min prior to thrombin stimulation, and cell viability was examined in order to discard a toxic effect from these drugs.

#### Western blot analysis

Following treatment, cells were disrupted in lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 1% CHAPS, 0.5% NP40, 0.1% BSA) containing protease and phosphatase inhibitors. The protein mixture was resolved by SDS-PAGE on 12.5% or 7.5% polyacrylamide gels, electro-transferred onto PVDF membranes and probed overnight with phospho-MLC or phospho-MYPT1 primary antibodies, after blocking non-specific binding with 5% fat-free milk. The membranes were then incubated with a secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase (Zymed, San Francisco, CA). The blots were developed by enhanced chemiluminescence (Millipore, Billerica, MA) and visualized in Kodak<sup>®</sup> X-ray films. Film images were digitized using an Alpha Digi-Doc system (Alpha-Innotech, San Leandro, CA), and quantitated using the Quantity One Software v4.6 from Biorad (Hercules, CA). The data from the densitometric analysis were expressed as the phospho-MLC to MLC ratio. Basal MLC phosphorylation from non-stimulated cells was arbitrarily set as 100% for the time-course and dose-dependence assays. When inhibitors were tested, MLC phosphorylation in thrombin-stimulated cultures was set as 100% (control). The same criterion was applied to quantify MYPT1 phosphorylation.

#### Rho activation assay

Active Rho was measured using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)-based G-LISA kit<sup>™</sup> according to the manufacturer's instructions. Following serum-deprivation and thrombin stimulation, cells were disrupted in lysis buffer, and lysates were snap-frozen in liquid nitrogen until use. Equal total protein samples were added to a 96-well dish coated with Rho-GTP-binding protein, in order to retain active Rho from cell lysates. Bound Rho-GTP was detected using a RhoA specific antibody followed by a secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase and a detection reagent. The signal was read by measuring absorbance at 490 nm using an Oplis microplate reader (Dyex Technologies, Chantilly, VA).

#### Immunofluorescent F-actin detection

In order to assess the reorganization of the actin cytoskeleton induced by thrombin in RPE cells in primary culture, cells from confluent 8-well chamber slides were serum deprived for 24 h and then stimulated with thrombin (2 U/ml) for the indicated period of time. When tested, the pharmacological inhibitors were added to the culture 30 min prior to thrombin stimulation. After treatment, cells were fixed in 2% paraformaldehyde for 20 min, permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 5 min then blocked for 30 min with 1% BSA. For actin staining, fixed cells were incubated with rhodamine-

conjugated phalloidin for 1 h at room temperature. Samples were mounted with Dako Fluorescence Mounting Medium (Dako North America, Inc., Carpinteria, CA) and visualized using an Olympus FluoView FV1000 confocal microscope (Olympus Tokyo, Tokyo, Japan). The exposure time and intensity gain were adjusted for providing optimal visualization, and were kept constant for all experiments. Fixed cells were viewed a single time and maintained in the dark until laser exposure in order to avoid photo-bleaching. F-actin fluorescence was quantified in three representative fields (15 cells per field) at 40 $\times$  magnification using Image-Pro Plus software. The data obtained were normalized by calculating fluorescence intensity/cell area. Each experiment was performed in triplicate.

#### Statistical analysis

Raw data for analysis were obtained from pooled RPE cells of 10–15 Long Evans rats in three independent experiments. Unpaired Student's *t*-test was applied for statistical analysis using the Prism V4.0 program from Graph Pad (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA). Statistical significance was determined using Student's *t*-test: \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001.

## Results

### Thrombin induces MLC phosphorylation in rat RPE cells

We first studied the effect of thrombin on rat RPE MLC phosphorylation by Western blot analysis, as the first step in acto-myosin driven cell contraction (Sah et al., 2000; Clark et al., 2007). As shown in Figure 1A, thrombin induces MLC phosphorylation in a concentration-dependent manner. This effect was prevented by co-incubation of thrombin with the specific inhibitor hirudin (Fig. 1C). Kinetic analysis showed that maximal MLC phosphorylation is attained as early as 2 min following thrombin stimulation, declining gradually thereafter (Fig. 1B).

### Thrombin induces MLC phosphorylation through PAR-1 activation

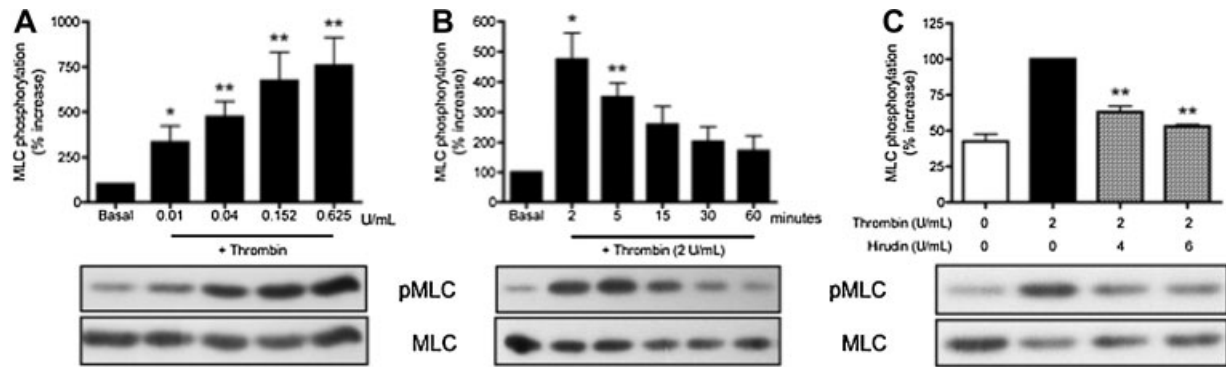
Intracellular thrombin signaling is activated via PAR-1, -3, and -4 (Coughlin, 2000). In order to identify the receptor subtype involved in thrombin-induced MLC phosphorylation, RPE cells were stimulated with specific thrombin receptor agonist peptides (TRAPs). Our results show that only the TRAP for PAR-1 induced a response equivalent to that of thrombin. Neither PAR-3 nor PAR-4 agonist peptides, alone or in combination, modified basal MLC phosphorylation (Fig. 2).

### Activation of Rho/ROCK mediates thrombin-induced MLC phosphorylation

The stimulation of GPCRs coupled to G<sub>12/13</sub> and G<sub>q</sub> signal to Rho GTPase activation (Sah et al., 2000). To explore this possibility we measured RhoA activation using a G-LISA<sup>™</sup> kit in RPE cells stimulated with thrombin. As shown in Figure 3A, significant activation of RhoA was observed at 2 min of thrombin treatment, followed by a rapid decline within 5 min of stimulation. Kinetics of RhoA activation showed a precise correlation with the time-course of MLC phosphorylation, suggesting a direct link between these two processes.

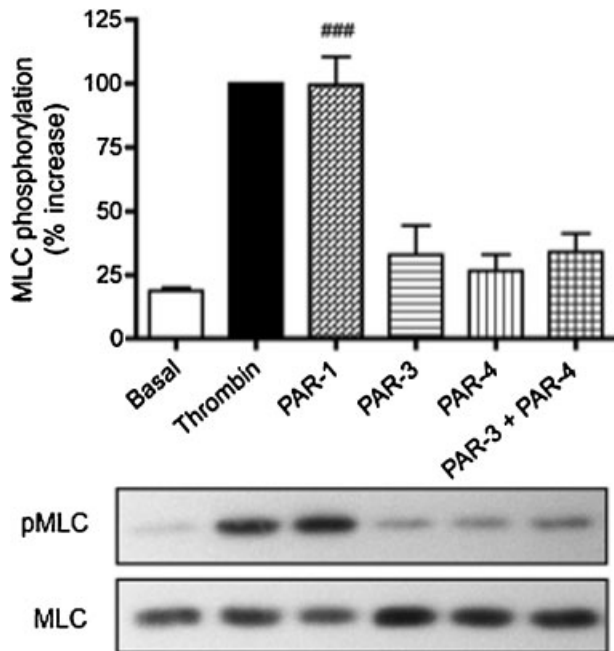
A main target of activated Rho is Rho kinase (ROCK), which regulates the level of MLC phosphorylation by MLC phosphorylation or by the inactivation of the MLCP (Sah et al., 2000; Hirano et al., 2003). To assess the role of ROCK in thrombin-induced MLC phosphorylation, RPE cells were pre-incubated with the 4-aminopyridine derivative Y-27632, a well-known ROCK inhibitor. Figure 3B shows that Y-27632 induced the dose-dependent inhibition of thrombin-induced MLC phosphorylation. We also tested thrombin effect on MYPT1 phosphorylation/inactivation. In agreement with the





**Fig. 1. Thrombin induces MLC phosphorylation in rat RPE cells.** RPE cells were serum-starved 24 h prior to stimulation with thrombin for 2 min. Whole cell extracts were immunoblotted using  $\alpha$ -phospho-MLC or  $\alpha$ -MLC antibodies. **A:** Thrombin induces MLC phosphorylation in a dose-dependent manner. **B:** Time-course of thrombin-induced MLC phosphorylation. Values from unstimulated cells were set as 100%. **C:** Inhibition of thrombin effect on MLC phosphorylation by thrombin specific inhibitor, hirudin. Thrombin and hirudin were co-incubated for 30 min at 37°C prior cell stimulation for 2 min. Values from thrombin-stimulated cells were set as 100%. Results are the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , Student's *t*-test.

previous result, thrombin induced MYPT1 time-dependent phosphorylation at Ser-668, with maximum at 2 min (Fig. 3C). Moreover, ROCK inhibition by Y-27632 completely prevented thrombin-induced MYPT1 phosphorylation (Fig. 3D). Together, these results demonstrate that the Rho/ROCK pathway mediates thrombin-induced stimulation of MLC phosphorylation in rat RPE cells.



**Fig. 2. Thrombin induces MLC phosphorylation through PAR-1.** RPE cells were serum-starved for 24 h, and stimulated for 2 min with thrombin (2 U/ml) or the agonist peptides (25  $\mu$ M) for PAR-1, PAR-3, PAR-4, or PAR-3 + PAR-4, as described in the Materials and Methods Section. Whole cell extracts were immunoblotted using  $\alpha$ -phospho-MLC or  $\alpha$ -MLC antibodies. Values for thrombin-stimulated cells were set as 100%. Results are the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. #### $P < 0.001$ , Student's *t*-test (basal vs. PAR-1).

**PLC- $\beta$ -dependent MLCK activation contributes to thrombin-induced MLC phosphorylation**

An additional enzyme involved in the regulation of MLC phosphorylation is the  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent MLCK (Somlyo and Somlyo, 2003). We tested the possible contribution of this pathway to thrombin-induced MLC phosphorylation using the pharmacological inhibition of MLCK by ML-7. Results showed  $\approx$ 50% reduction of thrombin-induced MLC phosphorylation in the presence of ML-7 (Fig. 4A).

PAR-1 coupling to members of the  $G_q$  family of G proteins results in the activation of PLC- $\beta$  and the elevation of intracellular  $Ca^{2+}$  (Coughlin, 2000), which could account for CaM-induced MLCK activation. To test this possibility, we pre-incubated RPE cells with the PLC- $\beta$  inhibitor U73122 and showed that PLC- $\beta$  inhibition reduced MLC phosphorylation to the same extent as ML-7 (Fig. 4B). These results suggest that PLC- $\beta$  stimulation by thrombin contributes to MLC phosphorylation via intracellular  $Ca^{2+}$  release, which further activates MLCK.

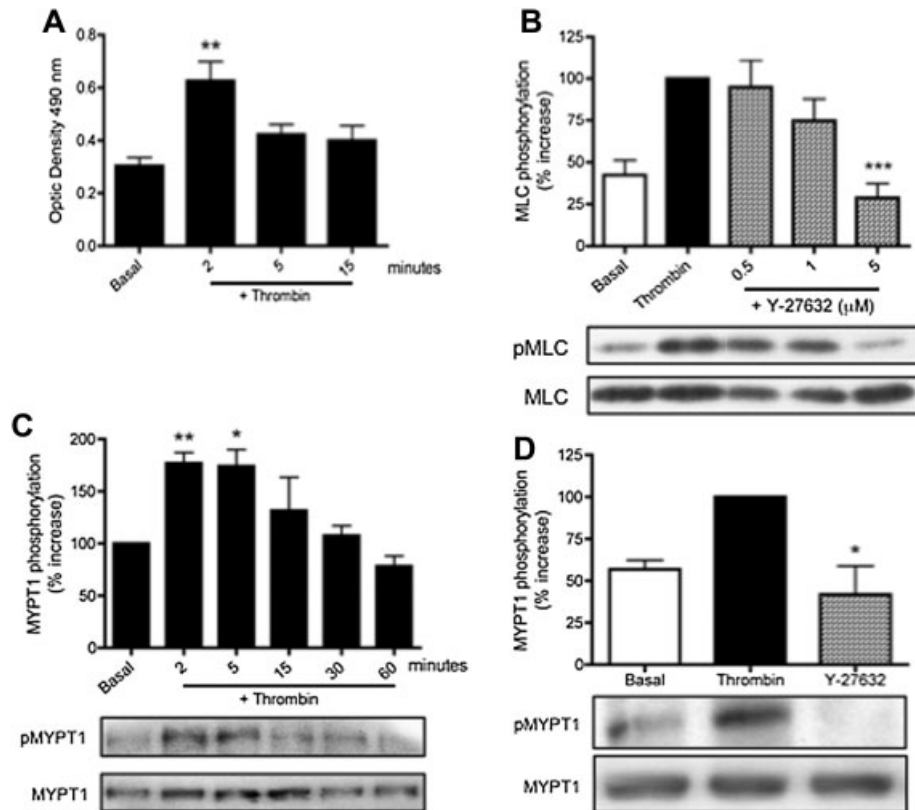
**Atypical PKC $\zeta$  involvement in thrombin-induced MLC phosphorylation**

The atypical PKC family isoform PKC $\zeta$  is activated in response to thrombin in endothelial (Li et al., 2004) and retinal pigment epithelial cells (Palma-Nicolas et al., 2008). Furthermore, MLC phosphorylation induced by phenylephrine and arachidonic acid is decreased by the inhibition of this enzyme (Gailly et al., 1997). In order to explore the possible role of PKC $\zeta$  in our system, we blocked its activation using a myristoylated peptide pseudosubstrate (PS). As shown in Figure 5, pretreatment of RPE cells with the PS completely prevented thrombin-induced MLC phosphorylation. Based on this result, we next inhibited phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), the main upstream activator of PKC $\zeta$  (Di Liberto et al., 2003). Pharmacological inhibition of PI3K by wortmannin or LY294002 abolished MLC phosphorylation induced by thrombin (Fig. 5, lanes 4 and 5, respectively), indicating that activation of the PI3K/PKC $\zeta$  pathway by thrombin action on PAR-1 leads to MLC phosphorylation, possibly through  $G_{\beta\gamma}$  subunit activation.

**Thrombin induces actin stress fiber formation in rat RPE cells**

Considerable evidence indicates that thrombin induces the reorganization of the actin cytoskeleton, which includes the





**Fig. 3.** The Rho/ROCK pathway mediates thrombin-induced MLC phosphorylation in rat RPE cells. RPE cells were serum-starved for 24 h prior to thrombin (2 U/ml) stimulation. **A:** Time-course for RhoA activation by thrombin. RhoA activation was measured by G-LISA™. **B:** Inhibition of thrombin-induced MLC phosphorylation by ROCK inhibition. Cells were pre-incubated with increasing doses of the specific ROCK inhibitor, Y-27632 for 30 min prior to stimulation with thrombin (2 U/ml) for 2 min. Whole cell extracts were immunoblotted using  $\alpha$ -phospho-MLC or  $\alpha$ -MLC antibodies. Values from thrombin-stimulated cells were set as 100%. **C:** Thrombin-induced MLCPase inhibition. The effect of thrombin (2 U/ml) on the phosphorylation/inactivation of the MLCP regulatory subunit MYPT1 was measured. Whole cell extracts were immunoblotted using  $\alpha$ -phospho-MYPT1 or  $\alpha$ -MYPT1 antibodies. Values from unstimulated cells were set as 100%. **D:** Thrombin inhibition prevents thrombin-induced MYPT1 phosphorylation. Cells were incubated with Y-27632 (5  $\mu$ M) for 30 min followed by stimulation with thrombin (2 U/ml) for 2 min. Values for thrombin-stimulated cells were set as 100%. Results are the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , Student's *t*-test.

formation of stress fibers and focal adhesion complexes (Sah et al., 2000). To evaluate thrombin effect on RPE cell morphology we determined the time-course of thrombin-stimulated actin stress fiber formation. After stimulation, cells were fixed and stained with rhodamine-conjugated phalloidin to visualize F-actin. As seen in Figure 6A, thin actin fibers with a diffuse pattern are present in non-stimulated cells. Upon thrombin stimulation for 2 min, F-actin is reorganized to form thick stress fibers across the cell. Quantitative analysis of fluorescence confirmed an increase in stress fiber formation (Fig. 6B), which remained evident up to 60 min in the presence of thrombin.

### Thrombin-induced actin stress fiber formation requires MLC phosphorylation

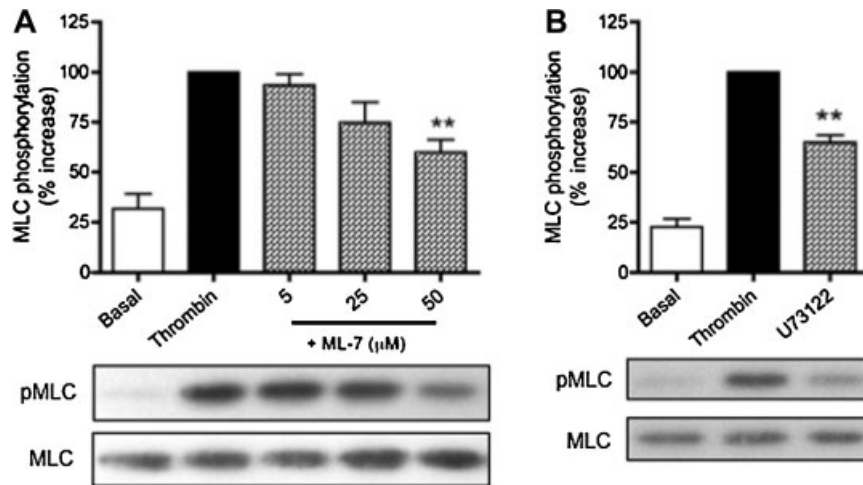
The reorganization of actin cytoskeleton is tightly linked to myosin-driven contraction initiated by MLC phosphorylation (Sah et al., 2000). In the next series of experiments, we evaluated thrombin-induced stress fiber formation in the presence of the pharmacological inhibitors shown previously to prevent MLC phosphorylation. As expected, co-incubation of thrombin with its specific inhibitor (hirudin), as well as the inhibitor of ROCK (Y-27632), MLCK (ML-7), or PKC $\zeta$  (PKC $\zeta$

PS), significantly attenuated actin stress fiber formation induced by thrombin (Fig. 7).

### Discussion

As a consequence of ocular damage involving BRB breakdown, RPE cells come in contact with blood components, thrombin among them, which is a common feature in the development of PVR following trauma, retinal detachment, metabolic alterations in diabetes, or retinal surgery aimed to re-attach the retina (Sakamoto et al., 1994; Pastor et al., 2002). Although thrombin-induced alteration of endothelial cell functions has been extensively described (Dudek and Garcia, 2001; Birukova et al., 2004), RPE responses to this protease remain poorly understood.

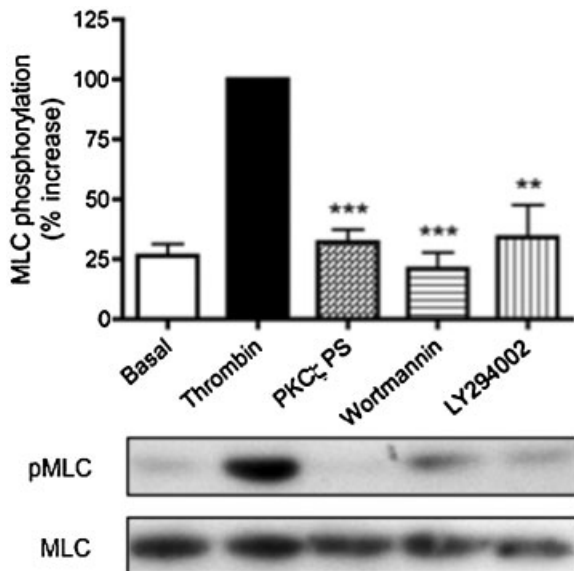
PVR is characterized by the epithelial-mesenchymal transformation and uncontrolled proliferation of otherwise quiescent RPE cells which, upon the assembly of actin stress fibers migrate to the vitreous and generate cellular membranes on both surfaces of the retina. The contraction of transformed RPE cells causes retinal detachment (Pastor et al., 2002). Acto-myosin driven contraction is initiated by the phosphorylation of regulatory MLCs by a network of kinases, including the Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent MLCK and the ROCK (Sah et al., 2000; Somlyo and Somlyo, 2003; Clark et al.,



**Fig. 4.** MLCK activation contributes to thrombin-induced MLC phosphorylation in rat RPE cells. RPE cells were serum-starved 24 h prior to thrombin stimulation. **A:** Dose-dependent inhibition of MLCK. Cells were pre-incubated with increasing doses of the specific MLCK inhibitor ML-7 for 30 min prior to stimulation with thrombin (2 U/ml) for 2 min. **B:** Effect of PLC- $\beta$  inhibition on thrombin-induced MLC phosphorylation. RPE cells were pre-incubated with the PLC- $\beta$  inhibitor U73122 (3  $\mu$ M) prior to thrombin stimulation for 2 min. Whole cell extracts were immunoblotted using  $\alpha$ -phospho-MLC or  $\alpha$ -MLC antibodies. Values from thrombin-stimulated cells were set as 100%. Results are the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \*\* $P < 0.01$ , Student's *t*-test.

2007). The aim of this work was to analyze if thrombin promotes MLC phosphorylation and actin stress fiber formation in RPE cells.

Based on evidence showing the promotion of cell proliferation due to the activation of the MAPK and the PKC signaling pathways triggered by thrombin activation of PAR-1



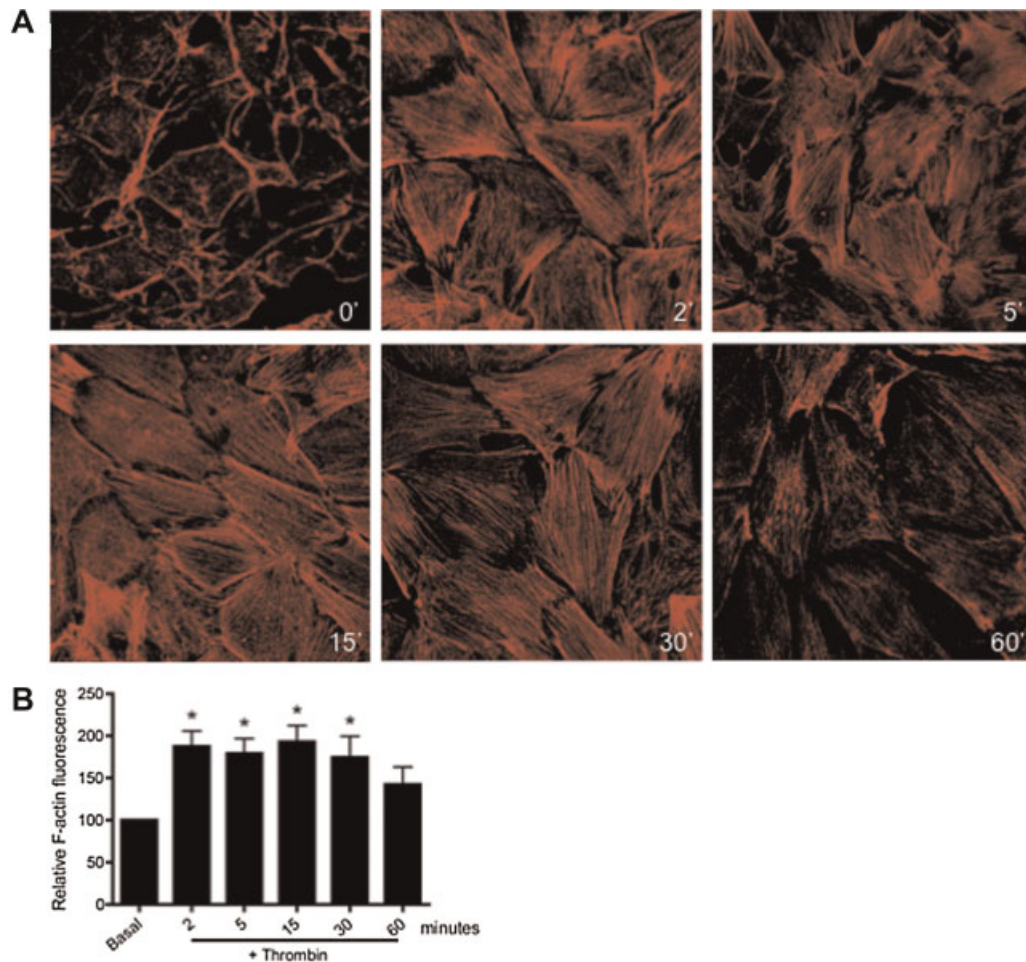
**Fig. 5.** Thrombin-induced MLC phosphorylation requires the activation of PI3K/PKC $\zeta$  signaling. RPE cells were serum-starved 24 h, and treated with the inhibitors prior to thrombin stimulation (2 U/ml for 2 min): PKC $\zeta$  PS (25  $\mu$ M) for PKC $\zeta$ , wortmannin (1  $\mu$ M), and LY294002 (50  $\mu$ M) for PI3K. Whole cell extracts were immunoblotted using  $\alpha$ -phospho-MLC or  $\alpha$ -MLC antibodies. Values from thrombin-stimulated cells were set as 100%. Results are the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , Student's *t*-test.

(Parrales et al., 2010), a role for thrombin in proliferative eye diseases such as PVR has been considered. Results from this study demonstrate, for the first time, that thrombin induces MLC phosphorylation in a time- and dose-dependent manner (Fig. 1A,B) through the specific activation of PAR-1 in rat RPE cells (Fig. 2). The specificity of thrombin effect through PAR-1 was established by the prevention of MLC phosphorylation by hirudin (Fig. 1C), and by the lack of effect of the TRAPs for PAR-3 and PAR-4 on MLC phosphorylation (Fig. 2).

Thrombin activation of PARs has been shown to activate distinct signaling pathways involved in the development of numerous diseases derived from the mesenchymal transition of epithelial cells. Particularly, PAR-1 coupling to G $_{q/11}$  and G $_{12/13}$  activates signaling cascades leading to MLCK and Rho activation (MacFarlane et al., 2001), which could contribute to the regulation of the phosphorylation state of MLC. Whereas MLC phosphorylation could be increased by the Ca $^{2+}$ /CaM-dependent activation of MLCK, ROCK would contribute to this outcome by both, inactivating the MLCP, and preventing actin depolymerization through the inhibition of cofilin (Somlyo and Somlyo, 2003).

We here analyzed the possible role of these kinases in thrombin-induced MLC phosphorylation, and demonstrated that the activation of ROCK and MLCK is required for thrombin effect yet, ROCK signaling seems to prevail in RPE cells, since its specific inhibition by Y-27632 abolished MLC phosphorylation (Fig. 3B), whereas the inhibition of MLCK by ML-7 attenuated but did not avert this effect (Fig. 4), in agreement with recent evidence from kidney epithelial cells showing that MLC phosphorylation in response to hyperosmotic stress is mediated mainly by ROCK, since Y-27632 had a stronger suppressive effect than ML-7 on MLC phosphorylation (Di Ciano-Oliveira et al., 2003).

In contrast with these results, MLCK seems to be the primary regulator of MLC phosphorylation in intestinal epithelial cells (Russo et al., 2005) and smooth muscle cells (Kamm and Stull, 2001). These controversial data suggest that the mechanism leading to MLC phosphorylation is possibly related to the particular calcium variation induced by the stimulating agent (Feng et al., 1999a), but could also derive from differences in the affinity of ROCK ( $K_m = 2.47 \pm 0.34$   $\mu$ M) and



**Fig. 6.** Thrombin induces the assembly of actin stress fibers in rat RPE cells. **A:** RPE cells were serum-starved 24 h prior to thrombin stimulation for the indicated time period. Cells were fixed and stained for F-actin using rhodamine-conjugated phalloidin. **B:** Relative quantification of the F-actin fluorescence modification induced by thrombin. Values from unstimulated cells were set as 100%. Results are the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \* $P < 0.05$ , Student's *t*-test.

MYPT1 ( $K_m = 0.10 \pm 0.01 \mu\text{M}$ ) for MLC, compared to MLCK ( $K_m = 34.5 \pm 2.8 \mu\text{M}$ ) (Feng et al., 1999b).

An alternative explanation to contrasting results regarding the regulation of MLC phosphorylation has been provided by studies on fibroblast migration (Totsukawa et al., 2004) and epithelial wound closure (Russo et al., 2005) in which ROCK activity seems to be responsible for the assembly of stress fibers in the cell center, whereas microfilament assembly at the cell periphery requires MLCK activity. Although we examined this possibility for RPE cells, the pharmacologic inhibition of MLCK and ROCK, did not yield detectable differences in thrombin-induced actin stress fiber subcellular distribution upon the individual inhibition of MLCK or ROCK in our system (Fig. 7). Overall, these results suggest that although both pathways are involved in the assembly of stress fibers leading to cell contraction, the regulation of this process varies among cell types.

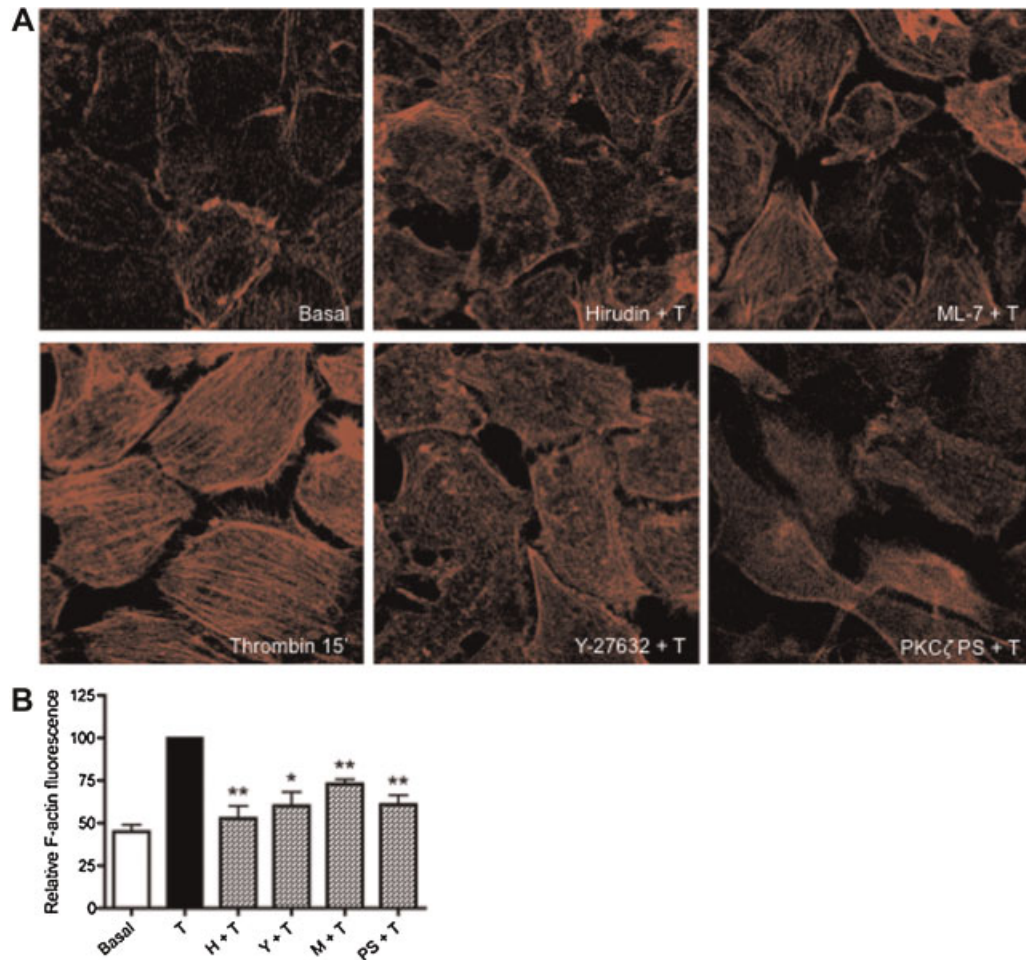
The activated form of  $G_{\alpha_{12}}$  and  $G_{\alpha_{13}}$  has been shown to promote stress fiber formation through Rho-dependent pathways (Sah et al., 2000). We showed that thrombin induces the activation of RhoA (Fig. 3A), very likely through PAR-1 coupling to  $G_{12/13}$  and the downstream activation of members of the family of GEFs for Rho, which includes p115RhoGEF, PDZ-RhoGEF, leukemia-associated RhoGEF, and Lbc

(Majumdar et al., 1999; Birukova et al., 2004; Siehler, 2009). This notion is supported by studies in constitutively active  $G_{\alpha_{12/13}}$  mutants, showing Rho-dependent induction of actin stress fiber formation, and the suppression of this effect by antibodies against  $G_{\alpha_{12/13}}$  (Majumdar et al., 1999; Sah et al., 2000).

Recent evidence has documented the promotion of Rho activation by a  $G_{\alpha_{13}}$ -independent mechanism, mediated by  $G_{\alpha_q}$ -coupled receptors (Chikumi et al., 2002). Controversy exists on this matter, since Rho activation in endothelial cells and the subsequent actin cytoskeleton re-arrangement has been shown to require the independent but cooperative activation of  $G_{12/13}$ - and of  $G_q$ -mediated PKC $\alpha$ -dependent pathways that converge at p115RhoGEF (Holinstat et al., 2003). Since PAR-1 couples to both,  $G_{12/13}$  and  $G_q$ , we cannot discard  $G_{\alpha_q}$  involvement in RhoA activation in our system, particularly since a partial inhibition of thrombin-induced MLC phosphorylation upon PLC- $\beta$  inhibition was observed (Fig. 4B).

The Rho-induced activation of ROCK promotes F-actin stress fiber formation by directly phosphorylating MLC and also indirectly, through the phosphorylation/inactivation of the regulatory subunit (MYPT1) of MLCP (Sah et al., 2000; Hirano et al., 2003). We showed that thrombin stimulates both MLC phosphorylation, and MLCP inactivation in a time-dependent manner (Fig. 3C), coincident with the time-course of RhoA





**Fig. 7.** The inhibition of MLC phosphorylation inhibits thrombin-induced actin stress fiber formation in rat RPE cells. **A:** RPE cells were serum-starved 24 h and then treated for 30 min with the following inhibitors prior to thrombin stimulation (2 U/ml for 15 min): Y-27632 (5  $\mu$ M) for ROCK, ML-7 (50  $\mu$ M) for MLCK, and PKC $\zeta$  PS (25  $\mu$ M) for PKC $\zeta$ . Thrombin and its specific inhibitor, hirudin, were co-incubated for 30 min at 37°C prior to cell stimulation for 15 min. Cells were then fixed and stained with rhodamine-conjugated phalloidin for F-actin. **B:** Relative quantification of F-actin fluorescence observed in (A). Values from thrombin-stimulated cells were set as 100%. Results are the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , Student's *t*-test. **B:** T, thrombin; H, hirudin; Y, Y-27632; M, ML-7; PS, PKC $\zeta$  PS.

activation and MLC phosphorylation (Figs. 1 and 3). Furthermore, the inhibition of ROCK by Y-27632 abolished thrombin-induced MLC phosphorylation as well as thrombin-induced MYPT1 phosphorylation (Fig. 3B,D), suggesting that the Rho/ROCK/MYPT1 pathway leads to an increase in MLC phosphorylation in response to thrombin in rat RPE cells. It is interesting mentioning that, in addition to its effect on MLC phosphorylation, ROCK has been shown to phosphorylate additional proteins that may contribute to actin stress fiber formation and further cell migration, such as LIM kinase (LIMK), adducin (Riento and Ridley, 2003), and junctional proteins that induce tight junction disruption upon phosphorylation (Yamamoto et al., 2008).

The partial inhibition of MLC phosphorylation by ML-7 suggested the involvement of the Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent MLCK in thrombin-induced MLC phosphorylation, possibly through PAR-1-triggered G<sub>q</sub>-mediated activation of PLC- $\beta$ , IP<sub>3</sub> formation and intracellular calcium elevation (Palma-Nicolas et al., 2008). This assumption was further confirmed by the inhibition of thrombin-induced MLC phosphorylation induced by the PLC- $\beta$  inhibitor U73122. As predicted, U73122 inhibited thrombin-induced MLC phosphorylation to the same extent as ML-7 suggesting that the elevation of intracellular calcium

concentration in response to G<sub>q</sub>-induced PLC- $\beta$  activity leads to CaM/MLCK activation, thus increasing MLC phosphorylation.

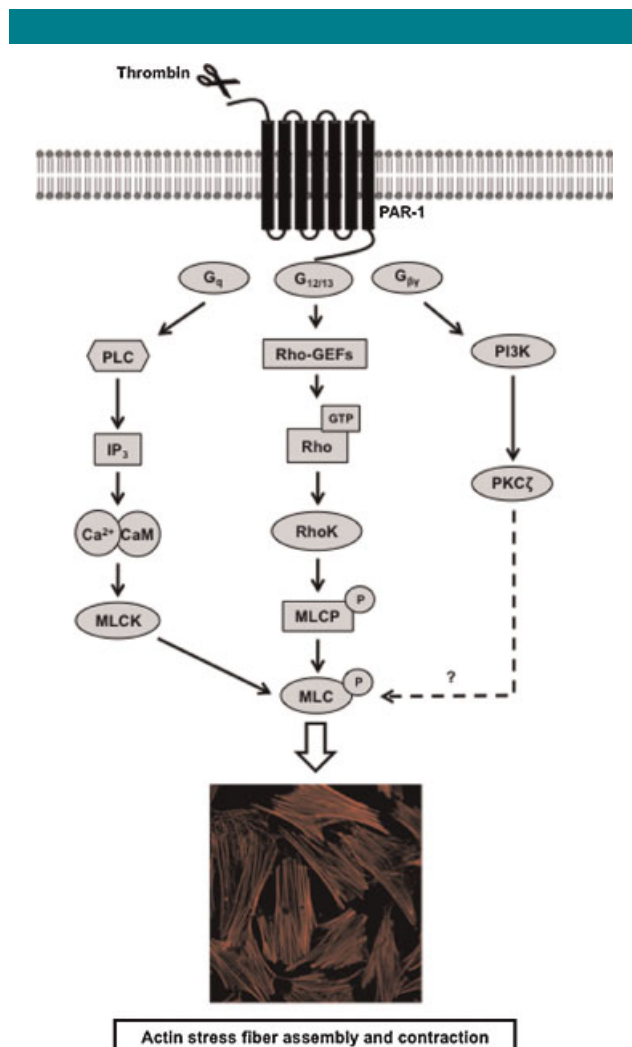
In addition to Rho-mediated signaling, actin stress fiber formation and tight junction disassembly of confluent cell monolayers has also been related to PKC activation, although the relevant isoforms and the mechanisms involved seem to be tissue-specific (Harhaj and Antonetti, 2004). PKC isoforms are classified according to their structure and activating mechanism in conventional ( $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$ ), activated synergistically by DAG and Ca<sup>2+</sup>; novel ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\mu$ , and  $\theta$ ), which are activated by DAG but lack the Ca<sup>2+</sup>-binding domain, and atypical isoforms ( $\zeta$  and  $\lambda/\iota$ ), which are activated by unsaturated fatty acids (Di Liberto et al., 2003).

Among these isoforms, strong evidence supports a role for atypical PKC $\zeta$  in the regulation of the actin cytoskeleton dynamics. A PI3K/PKC $\zeta$ -dependent pathway seems to regulate endothelin-1-induced contraction of myometrial cells, in which colocalization of PKC $\zeta$  with actin microfilaments suggests actin or actin-binding proteins as targets for PKC $\zeta$  phosphorylation (Di Liberto et al., 2003). Also on this line, PKC $\zeta$  has been proposed as the downstream effector of Rho activation leading to actin polymerization in human neutrophils exposed to chemoattractants (Laudanna et al., 1998), as well as in

IL-2-stimulated T cells (Gómez et al., 1997). Furthermore, thrombin has been shown to induce an increase in endothelial cell permeability through the Rho-independent activation of PKC $\zeta$  (Li et al., 2004).

We demonstrated here that MLC phosphorylation induced by thrombin is totally prevented by the pseudosubstrate peptide for the inhibitory region of PKC $\zeta$  (Fig. 5), in agreement with previous work showing that MLC phosphorylation induced by phenylephrine and by arachidonic acid is prevented by PKC $\zeta$  inhibition in smooth muscle cells (Gailly et al., 1997).

Thrombin activates PI3K-dependent pathways in several cell types (MacFarlane et al., 2001), including RPE cells (Palma-Nicolas et al., 2008), mainly through a process mediated by the G $\beta\gamma$  subunit of receptor-coupled heterotrimeric G-proteins. Since PKC $\zeta$  is known to act downstream of PI3K (Di Liberto et al., 2003), we tested the effect of PI3K inhibition on thrombin-induced MLC phosphorylation (Fig. 5) and showed that wortmannin and LY294002 prevented this effect, suggesting PI3K as the upstream activator of PKC $\zeta$ . Hence, thrombin-induced RhoA activation together with that of PI3K could lead to PKC $\zeta$  activation in our system. Additionally, PI3K could induce MLC phosphorylation through the integrin-linked kinase (ILK), which is known to phosphorylate MLC directly, or alternatively is capable of phosphorylating CPI-17, leading to MLCP inhibition (Huang et al., 2006).



**Fig. 8.** Proposed model for cell signaling involved in thrombin-induced MLC phosphorylation on rat RPE cells. See text for details.

In addition to the stimulation of MLC phosphorylation, the present work demonstrated that thrombin promotes actin stress fiber formation in RPE cells. Both these processes followed a coincident time-dependent pattern (Fig. 6), suggesting a causal relationship of MLC phosphorylation with the assembly of actin stress fibers. In support of this assumption, the prevention of thrombin-induced MLC phosphorylation by the pharmacological inhibition of MLCK, ROCK, and atypical ( $\zeta$ ) PKC isoforms prevented thrombin-induced actin stress fiber formation (Fig. 7), in agreement with previous studies in endothelial (Birukova et al., 2004; Nobe et al., 2005), and epithelial cells (Gavara et al., 2006).

A complex signaling network is now emerging, in which distinct pathways activated by thrombin converge on MLC phosphorylation. A possible signaling pathway for thrombin regulation of MLC phosphorylation in RPE cells is depicted in Figure 8: thrombin activates PAR-1-coupled heterotrimeric G proteins G $_{12/13}$  and G $_{\alpha q}$ . G $_{\alpha 12/13}$  stimulation of RhoGEFs induces the activation of Rho which in turn, promotes ROCK activity and inhibits MLCP, leading to an increase in phospho-MLC level. In parallel, G $_{\alpha q}$ /PLC- $\beta$  triggers phosphoinositide hydrolysis, resulting in IP $_3$ -mediated calcium mobilization. Elevation of intracellular calcium concentration leads to CaM/MLCK activation, thus increasing MLC phosphorylation. Additionally, G $\beta\gamma$  subunits may activate PI3K/PKC $\zeta$  and MLC phosphorylation. Finally, MLC phosphorylation induced by this signaling cascade promotes actin stress fiber formation, required for cellular contraction and motility.

The prevention of MLCK and ROCK activation has been proposed as a therapeutic target in diseases characterized by MLC phosphorylation and stress fiber formation (Miura et al., 2006). Our findings demonstrate that the activation of Rho-dependent signaling pathways leading to MLC phosphorylation and actin stress fiber assembly is an important determinant in cell transformation in conditions which expose RPE cells to thrombin, and hence could be involved in the development of PVR.

### Acknowledgments

This work was partially supported by grants CB-80398 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología and IN200209 from Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica/UNAM (to A.M.L.C.).

### Literature Cited

- Birukova AA, Smurova K, Birukov KG, Kaibuchi K, Garcia JGN, Verin AD. 2004. Role of Rho GTPases in thrombin-induced lung vascular endothelial cells barrier dysfunction. *Microvasc Res* 67:64–77.
- Chikumi H, Vázquez-Prado JM, Servitja JM, Miyazaki H, Gutkind SJ. 2002. Potent activation of RhoA by G $\alpha_q$  and G $\alpha_{12/13}$ -coupled receptors. *J Biol Chem* 277:27130–27134.
- Chong LD, Traynor-Kaplan A, Bokoch GM, Schwartz MA. 1994. The small GTP-binding protein Rho regulates a phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase in mammalian Cells. *Cell* 79:507–513.
- Clark K, Langeslag M, Figdor CG, van Leeuwen FN. 2007. Myosin II and mechanotransduction: A balancing act. *Trends Cell Biol* 17:178–185.
- Coughlin SR. 2000. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature* 407:258–264.
- Di Ciano-Oliveira C, Sirokmány G, Szászi K, Arthur WT, Masszi A, Peterson M, Rotstein OD, Kapus A. 2003. Hyperosmotic stress activates Rho: Differential involvement in Rho kinase-dependent MLC phosphorylation and NKCC activation. *Am J Physiol Cell Physiol* 285:C555–C566.
- Di Liberto G, Dallot E, Parco EL, Cabrol D, Ferré F, Breuille-Fouché M. 2003. A critical role for PKC $\zeta$  in endothelin-1-induced uterine contractions at the end of pregnancy. *Am J Physiol Cell Physiol* 285:C599–C607.
- Dudek SM, Garcia JGN. 2001. Cytoskeletal regulation of pulmonary vascular permeability. *J Appl Physiol* 91:1487–1500.
- Essler M, Amano M, Kruse HJ, Kaibuchi K, Weber PC, Aepfelbacher M. 1998. Thrombin inactivates myosin light chain phosphatase via Rho and its target Rho kinase in human endothelial cells. *J Biol Chem* 273:21867–21874.
- Etienne-Manneville S, Hall A. 2002. Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420:629–635.
- Feng J, Ito M, Ichikawa K, Isaka N, Nishikawa M, Hartshorne DJ, Nakano T. 1999a. Inhibitory phosphorylation site for Rho-associated kinase on smooth muscle myosin phosphatase. *J Biol Chem* 274:37385–37390.
- Feng J, Ito M, Kureishi Y, Ichikawa K, Amano M, Isaka N, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K, Hartshorne DJ, Nakano T. 1999b. Rho-associated kinase of chicken gizzard smooth muscle. *J Biol Chem* 274:3744–3752.
- Fukata Y, Amano M, Kaibuchi K. 2001. Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *Trends Pharmacol Sci* 22:32–39.

- Gailly P, Gong MC, Somlyo AV, Somlyo AP. 1997. Possible role of atypical protein kinase C activated by arachidonic acid in  $Ca^{2+}$  sensitization of rabbit smooth muscle. *J Physiol* 500:95–109.
- Gavara N, Sunyer R, Roca-Cusachs P, Farré R, Rotger M, Navajas D. 2006. Thrombin induced contraction in alveolar epithelial cells probed by traction microscopy. *J Appl Physiol* 101:512–520.
- Gómez J, García A, Borlado LR, Bonay P, Martínez-A C, Silva A, Fresno M, Carrera AC, Eicher-Streiber C, Rebollo A. 1997. IL-2 signaling controls actin organization through Rho-like protein family, phosphatidylinositol 3-kinase, and protein kinase C-zeta. *J Immunol* 158:1516–1522.
- Harhaj NS, Antonetti DA. 2004. Regulation of tight junctions and loss of barrier function in pathophysiology. *Int J Biochem Cell Biol* 36:1206–1237.
- Hayashi S, Takeuchi K, Suzuki S, Tsunoda T, Tanaka C, Majima Y. 2006. Effect of thrombin on permeability of human epithelial cell monolayers. *Pharmacology* 76:46–52.
- Hirano K, Derkach DN, Hirano M, Nishimura J, Kanaide H. 2003. Protein kinase network in the regulation and dephosphorylation of smooth muscle myosin light chain. *Mol Cell Biochem* 248:105–114.
- Holinstat M, Mehta K, Kozasa T, Minshall RD, Malik AB. 2003. Protein kinase Calpha-induced p115RhoGEF phosphorylation signals endothelial cytoskeletal rearrangement. *J Biol Chem* 278:28793–28798.
- Hollborn M, Petto C, Steffen A, Trettner S, Bendig A, Wiedemann P, Bringmann A, Kohlen L. 2009. Effects of thrombin on RPE cells are mediated by transactivation of growth factor receptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50:4452–4459.
- Huang J, Mahavadi S, Sriwai W, Hu W, Murthy KS. 2006. Gi-coupled receptors mediate phosphorylation of CPI-17 and MLC<sub>20</sub> via preferential activation of the PI3K/ILK pathway. *Biochem J* 396:193–200.
- Ito M, Nakano T, Erdödi F, Hartshorne DJ. 2004. Myosin phosphatase: Structure, regulation and function. *Mol Cell Biochem* 259:197–209.
- Kamm KE, Stull JT. 2001. Dedicated myosin light chain kinases with diverse cellular functions. *J Biol Chem* 276:4527–4530.
- Laudanna C, Mochly-Rosen D, Liron T, Constantin G, Butcher EC. 1998. Evidence of  $\zeta$  protein kinase C involvement in polymorphonuclear neutrophil integrin-dependent adhesion and chemotaxis. *J Biol Chem* 273:30306–30315.
- Li X, Hahn CN, Parsons M, Drew J, Vadas MA, Gamble JR. 2004. Role of protein kinase C $\zeta$  in thrombin-induced endothelial permeability changes: Inhibition by angiopoietin-1. *Blood* 104:1716–1724.
- MacFarlane SR, Seatter MJ, Kanke T, Hunter GD, Plevin R. 2001. Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev* 53:245–282.
- Maekawa M, Ishizaki T, Boku S, Watanabe N, Fujita A, Iwamatsu A, Obinata T, Ohashi K, Mizuno K, Narumiya S. 1999. Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIMK. *Science* 285:895–898.
- Majumdar M, Seasholtz TM, Buckmaster C, Tokzos D, Heller-Brown J. 1999. A Rho exchange factor mediates thrombin and  $G_{\alpha_{12}}$ -induced cytoskeletal responses. *J Biol Chem* 274:26815–26821.
- Mehta D, Rahman A, Malik AB. 2001. Protein kinase C- $\alpha$  signals Rho-guanine nucleotide dissociation inhibitor phosphorylation and Rho activation and regulates the endothelial cell barrier function. *J Biol Chem* 276:22614–22620.
- Miura M, Hata Y, Hirayama K, Kita T, Noda Y, Fujisawa K, Shimokawa H, Ishibashi T. 2006. Critical role of the Rho-kinase pathway in TGF- $\beta$ 2-dependent collagen gel contraction by retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res* 82:849–859.
- Nobe K, Sone T, Paul RJ, Honda K. 2005. Thrombin-induced force development in vascular endothelial cells: Contribution to alteration of permeability mediated by calcium-dependent and -independent pathways. *J Pharmacol Sci* 99:252–263.
- Pacheco-Domínguez RL, Palma-Nicolás JP, López E, López-Colomé AM. 2008. The activation of MEX-ERK1/2 by glutamate receptor-stimulation is involved in the regulation of RPE proliferation and morphologic transformation. *Exp Eye Res* 86:207–219.
- Palma-Nicolás JP, López E, López-Colomé AM. 2008. PKC isoenzymes differentially modulate thrombin effect on MAPK-dependent RPE proliferation. *Biosci Rep* 28:307–317.
- Parrales A, Palma-Nicolás JP, López E, López-Colomé AM. 2010. Thrombin stimulates RPE cell proliferation by promoting c-Fos-mediated cyclin D1 expression. *J Cell Physiol* 222:302–312.
- Pastor JC, de la Rúa ER, Martín F. 2002. Proliferative vitreoretinopathy: Risk factors and pathobiology. *Prog Retin Eye Res* 21:127–144.
- Patterson CE, Davis HW, Schaphorst KL, García JGN. 1994. Mechanisms of cholera toxin prevention of thrombin- and PMA-induced endothelial barrier dysfunction. *Microvasc Res* 48:212–235.
- Ridley AJ, Hall A. 1992. The small GTP-binding protein Rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 70:389–399.
- Riento K, Ridley A. 2003. Rocks: Multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:446–456.
- Russo JM, Florian P, Shen L, Graham WV, Tretiakova MS, Gitter AH, Mrsny RJ, Turner JR. 2005. Distinct temporal-spatial roles for Rho kinase and myosin light chain kinase in epithelial purse-string wound closure. *Gastroenterology* 128:987–1001.
- Sah VP, Seasholtz TM, Sagi SA, Heller-Brown J. 2000. The role of Rho in G protein-coupled receptor signal transduction. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40:459–489.
- Sakamoto T, Nakashima Y, Sueishi K. 1993. The effect of thrombin on actin filament and vinculin of corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34:438–446.
- Sakamoto T, Sakamoto H, Sheu SJ, Gabrielian K, Ryan SJ, Hinton DR. 1994. Intercellular gap formation induced by thrombin in confluent cultured bovine retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35:720–729.
- Satpathy M, Gallagher P, Lisote-Waniewski M, Srinivas SP. 2004. Thrombin-induced phosphorylation of the regulatory light chain of myosin II in cultured bovine corneal endothelial cells. *Exp Eye Res* 79:477–486.
- Siehrer S. 2009. Regulation of RhoGEF proteins by  $G_{12/13}$ -receptors. *Br J Pharmacol* 158:41–49.
- Somlyo AP, Somlyo AV. 2003.  $Ca^{2+}$  sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: Modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev* 83:1325–1358.
- Strauss O. 2005. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev* 85:845–881.
- Totsukawa G, Wu Y, Sasaki Y, Hartshorne DJ, Yamakita Y, Yamashiro S, Matsumura F. 2004. Distinct roles of MLCK and ROCK in the regulation of membrane protrusions and focal adhesion dynamics during cell migration. *J Cell Biol* 164:427–439.
- Verkhovskiy AB, Svitzkina TM, Borisy GG. 1995. Myosin II filament assembly in the active lamella of fibroblasts: Their morphogenesis and role in the formation of actin filament bundles. *J Cell Biol* 131:989–1002.
- Yamamoto M, Ramirez SH, Sato S, Kiyota T, Cerny RL, Kaibuchi K, Persidsky Y, Ikezu T. 2008. Phosphorylation of claudin-5 and occludin by Rho kinase in brain endothelial cells. *Am J Pathol* 172:521–533.
- Yoshida A, Elnar SG, Bian ZM, Kunkel SL, Lukacs NW, Elnar VM. 2001. Thrombin regulates chemokine induction during human retinal pigment epithelial cell/monocyte interaction. *Am J Pathol* 159:1171–1180.
- Zheng Y, Bando H, Ikuno Y, Oshima Y, Sawa M, Ohji M, Tano Y. 2004. Involvement of Rho-kinase pathway in contractile activity of rabbit RPE cells in vivo and in Vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:668–674.
- Zolotarevsky Y, Hecht G, Koutsouris A, Gonzalez DE, Quan C, Tom J, Mrsny RJ, Turner JR. 2002. A membrane-permeant peptide that inhibits MLC kinase restores barrier function in vitro models of intestinal disease. *Gastroenterology* 123:163–172.