



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR  
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

EFFECTO DE LA TROMBINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES  
INVOLUCRADOS EN EL CONTROL DEL CICLO CELULAR EN  
CÉLULAS DEL EPITELIO PIGMENTADO DE LA RETINA

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

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

**BIOL. ALEJANDRO PARRALES BRIONES**

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.

Esta tesis se llevo a cabo en el departamento de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Ana María López Colomé.

La investigación llevada a cabo durante este trabajo fue parcialmente financiado por los donativos otorgados por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, proyecto CB-80398), y por el programa de Apoyo a Proyectos de Investigación en Innovación Tecnológica (PAPIIT, proyecto IN-200209).

El Comité Tutorial estuvo conformado por los Doctores: Ana María López Colomé, Alejandro Zentella Dehesa y Guadalupe Reyes Cruz.

El Jurado del Examen de grado estuvo conformado por los Doctores: Ana María López Colomé, Fernando López Casillas, JoséVázquez Prado, Marina Macias Silva y Martha Robles Flores.

## **Agradecimientos**

A la Dra. Ana María López Colomé por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y por su tiempo dedicado en mi formación profesional.

A los miembros del Comité Tutoral, los Doctores: Alejandro Zentella Dehesa y Guadalupe Reyes Cruz, por sus valiosas sugerencias cada reunión semestral, y por contribuir con mi formación académica.

A los miembros del Jurado del Examen de grado, los Doctores: Fernando López Casillas, JoséVázquez Prado, Marina Macias Silva y Martha Robles Flores, por sus valiosos comentarios y correcciones en la elaboración de esta tesis.

A la Q. F. B. Edith Catalina López Hernández por su excelente e insuperable apoyo técnico.

Al Dr. José Prisco Palma Nicolás por su apoyo técnico.

A la Unidad de Investigación del Instituto de oftalmología Conde de Valenciana y a la Dra. Diana Escalante Alcalde por su colaboración y asesoría durante el desarrollo de este trabajo.

A todos mis compañeros de laboratorio por la excelente convivencia, comprensión y apoyo durante los momentos de trabajo.

## **Dedicatorias**

A mis padres, Abel y Amalia, quienes siempre han sido el perfecto ejemplo a seguir en todos los aspectos de la vida; la motivación constante para realizar los sueños; la más grande e indudable demostración de amor; pero sobretodo por compartir, gozar y sufrir la vida conmigo. El hogar y la familia que nos dieron es el mejor regalo, ¡soy muy afortunado por tenerlos!

A mi hermano, quien sé goza tanto como yo mis éxitos y siempre ha sido un maravilloso compañero de vida.

A mi esposa, Consuelo Pérez, por ser mi motivación más grande para el presente y futuro, por ser la persona que me alegra, apoya e impulsa día a día, pero sobretodo por siempre regalarme la más hermosa de las sonrisas y estar a mi lado en los momentos complicados. Sabes que te amo mucho más allá de todas estas letras.

A mis hermanos de vida, Esteban, Omar, Kika, Rodrigo, Kiuka y Lulú, todos han sido muy importantes en distintos momentos de mi vida, han compartido un gran número de experiencias y me han hecho sentir muy especial, el encontrarme con ustedes es una de las mayores fortunas de mi vida, el mantenerlos en mi vida ha sido el mayor de los aciertos.

A mis tíos, primos, familia en general, gracias por estar presentes siempre en los momentos difíciles y agradables, ustedes potencian las alegrías y disminuyen las tristezas.

A Ari y Edith, por compartir el laboratorio y una parte de nuestras vidas durante esta locura llamada investigación, son personas maravillosas que espero poder mantener cerca de mi vida siempre.

A mis amigos del IFC, por ser compañía importante durante casi 9 años, y por aguantar el cúmulo de locuras que significo estar en el instituto, espero la vida nos siga manteniendo en contacto.

# Índice

<b>Abreviaturas</b>	1
<b>Resumen</b>	2
<b>Abstract</b>	4
<b>1. Introducción</b>	5
1.1. La retina y el epitelio pigmentado de la retina (EPR)	5
Características morfológicas	7
Características funcionales	8
1.2. Trombina	9
Fenómenos regulados por la trombina	9
Receptores activados por proteasas (PARs)	10
PAR1	12
1.3. Trombina y proliferación	12
1.4. Ciclo celular	14
Ciclinas y cinasas dependientes de ciclinas (CDKs)	15
Ciclina D1	16
1.5. Vías de señalamiento involucradas en la proliferación celular	17
Cinasas Activadas por mitogenos (MAPK)	17
Isoformas convencionales de las cinasas de proteínas C (cPKC)	18
Cinasa del fosfato de inositol 3 y proteína cinasa B (PKB/Akt)	20
Blanco de la rapamicina en mamíferos (mTOR)	22
Cinasas dependientes de calcio/calmodulina (CaMKs)	23
Proteína G pequeña Rho	25
1.6. Factores de transcripción involucrados en la proliferación celular	27
Factores de transcripción de la familia AP1	27
Factor nuclear KB (NFKB)	27
<b>2. Planteamiento del problema</b>	29
<b>3. Hipótesis</b>	31
<b>4. Objetivo</b>	32
<b>5. Materiales y método</b>	33
5.1. Reactivos	33
5.2. Cultivo de EPR	33
5.3. Ensayo de viabilidad celular	34
5.4. Medición de la proliferación de las células del EPR	34
5.5. Análisis de la progresión del ciclo celular en el EPR	35
5.6. Cuantificación del ARN mensajero de ciclina D1 y c-fos	35
5.7. Expresión de los receptores activados por proteasas en el EPR	36
5.8. Inmunodetección de proteínas	36
5.9. Inmunocitoquímica	37

5.10. Silenciamiento de la ciclina D1	38
5.11. Análisis estadístico	38
<b>6. Resultados</b>	<b>39</b>
6.1. Efecto de la trombina sobre la proliferación de las células del EPR	39
6.2. La trombina induce la expresión y la localización nuclear de la ciclina D1	40
6.3. La trombina induce la expresión de ciclina D1 a través de la activación de PAR1	42
6.4. La proliferación inducida por la trombina requiere de la expresión de ciclina D1	42
6.5. Efecto de la inhibición de las MAPK MEK1-2 y de la PI3K sobre la expresión de la ciclina D1	43
6.6. Se requiere la activación de las PKCs convencionales para la expresión de la ciclina D1 inducida por la trombina	44
6.7. La trombina induce la expresión de c-Fos	45
6.8. Efecto de la inhibición de MEK1-2 y de las PKC convencionales sobre la expresión de c-Fos	45
6.9. Se requiere la estimulación sostenida con trombina para inducir la expresión de ciclina D1 y la proliferación celular en el EPR	46
6.10. La trombina induce la activación de Akt en las células del EPR	47
6.11. La activación de Akt inducida por la trombina requiere de la actividad de los receptores para EGF y PDGF	49
6.12. La activación de Akt inducida por la trombina requiere el señalamiento de PI3K, de la PLC y de la calmodulina	51
6.13. Se requiere la activación de la PDK1 y de Akt para la proliferación y para la expresión de ciclina D1 inducidas por la trombina	52
6.14. La trombina induce la fosforilación de GSK-3 $\beta$ por un mecanismo dependiente de Akt	52
<b>7. Discusión</b>	<b>54</b>
<b>8. Conclusión</b>	<b>62</b>
<b>9. Referencias</b>	<b>64</b>
<b>10. Artículos</b>	<b>75</b>

## Abreviaturas

Akt	Proteína cinasa B
AMP	Monofosfato de adenosina
CaMKs	Cinasa dependiente de calcio y calmodulina
CDK	Cinasa dependiente de ciclina
CREB	Proteína de unión al elemento de respuesta al AMP cíclico
DAG	Diacilglicerol
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EPR	Epitelio pigmentado de la retina
ERK	Cinasas reguladas por señales extracelulares
GDP	Bifosfato de guanosina
GEF	Proteína intercambiadora de nucleótidos de guanina
GPCR	Receptores acoplados a proteínas G
GTP	Trifosfato de guanosina
IKK	Cinasa de la proteína inhibidora de NFκB
IP <sub>3</sub>	Trifosfato de inositol
MAPK	Cinasas de proteínas activadas por mitógenos
MEK	Cinasa de la cinasa activada por mitógenos
mTOR	Blanco de la rapamicina en mamíferos
NFκB	Factor nuclear κB
PARs	Receptores activados por proteasas
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PDK1	Cinasa dependiente de fosfoinositidos 1
PI3K	Fosfatidil inositol-3 cinasa
PKC	Proteína cinasa C
PLCβ	Fosfolipasa C beta
RPE65	Proteína de 65 KDa específica del epitelio pigmentado de la retina
RTK	Receptores con actividad de cinasa de tirosina
SRE	Elemento de respuesta al suero
SRF	Factor de respuesta al suero
VRP	Vitreorretinopatía proliferativa



## Resumen

El Epitelio Pigmentado de la Retina (EPR) se localiza entre la retina neural y la coroides y juega un papel central en el funcionamiento de la retina neural. La proliferación descontrolada del EPR lleva a la formación de membranas colágeno-celulares sobre ambas superficies de la retina, características de la Vitreorretinopatía Proliferativa (VRP), padecimiento que conduce a la ceguera. Se ha propuesto que la ruptura de la barrera hematorretiniana podría ser el agente causal de la VRP, debido a la interacción de las células del EPR con componentes sanguíneos, entre los que destaca la trombina. La trombina es una proteasa multifuncional de serina contenida en la sangre que tiene un papel central en la cascada de coagulación. Además de la importancia dentro de la cascada de coagulación se ha demostrado que la trombina induce la activación plaquetaria, estimula la secreción de factores de crecimiento, promueve la angiogénesis y es un potente mitógeno en distintos tipos celulares, sin embargo, los mecanismos moleculares a través de los cuales induce la proliferación no han sido completamente estudiados. La trombina ejerce sus efectos celulares mediante la interacción con receptores acoplados a proteínas G denominados “receptores activados por proteasas” (PARs). Los PARs se activan por proteólisis del extremo N-terminal, lo que expone una nueva secuencia terminal que actúa como ligando del propio receptor. PAR1 es el prototipo de esta familia de receptores y su activación induce aumento en las concentraciones intracelulares de trifosfato de inositol ( $IP_3$ ), de diacilglicerol (DAG) y de  $Ca^{2+}$ , estimulando la activación de diversas vías de señalamiento importantes en la regulación de la proliferación, tales como PKC convencionales, MAPK ERK1/2 y PI3K/Akt; asimismo, regula la expresión de elementos clave en el control del ciclo celular como ciclina D1 y ciclina E. Recientemente se ha observado que PAR1 se sobre-expresa en tumores metastásicos y que los niveles de expresión de dicho receptor correlacionan con el grado de invasividad de las células tumorales. En este trabajo demostramos que: 1) la trombina induce la proliferación del EPR de rata a través del aumento de la expresión de la ciclina D1, mediado por la activación de la vía PI3K/PDK1/Akt, de las PKC convencionales y de las MAPKs ERK1/2, 2) la trombina promueve la expresión bifásica de c-Fos, y 3) se requiere de la estimulación sostenida con trombina para inducir la expresión de ciclina D1 y la proliferación en células del EPR de rata. Debido a que la ciclina D1 es necesaria para la progresión del ciclo celular y se considera un nexo entre las señales mitogénicas externas y el ciclo celular, nuestros resultados contribuyen a esclarecer los mecanismos involucrados en las patologías proliferativas del EPR, definición requerida para el diseño de

procedimientos terapéuticos para prevenir las patologías fibroproliferativas, tales como la VRP y el cáncer.

## Abstract

The retinal pigment epithelium (RPE) is located between the neural retina and choroid and plays a central role in the visual function and the neural retina maintenance. The uncontrolled proliferation of the RPE leads to the formation of cellular- collagen membranes on both surfaces of the retina, characteristic of Proliferative Vitreoretinopathy (PVR), a condition that leads to blindness. It has been proposed that the blood-retina barrier breakdown may promote the development of PVR, due to the interaction of RPE cells with blood components, such as thrombin. Thrombin is a multifunctional serine protease contained in the blood that plays a central role in the coagulation cascade. Besides its importance within the coagulation cascade, it has been shown that thrombin induces platelet activation, stimulates the secretion of growth factors, promotes angiogenesis and is a potent mitogen in different cell types; however, the molecular mechanisms by which thrombin induces proliferation have not been fully understood. Thrombin exerts its cellular effects through interaction with G protein-coupled receptors called "protease-activated receptors" (PARs). PARs are activated by proteolysis of the N-terminus, exposing a new N-terminal sequence which acts as intramolecular ligand. PAR1 is the prototype of this family of receptors and their activation increases intracellular concentrations of inositol triphosphate (IP<sub>3</sub>), diacylglycerol (DAG) and Ca<sup>2+</sup>, stimulating the activation of several signaling pathways important in the regulation of proliferation, such as conventional PKC (cPKC), MAPK ERK1-2 and PI3K/Akt. Thrombin-induced PAR1 activation promotes the expression of key elements in cell cycle control, such as cyclin D1 and cyclin E. Recently, it has been observed that PAR1 is over-expressed in metastatic tumors and the expression levels of this receptor correlates with the degree of tumor cells invasiveness. In this study we demonstrate that: 1) thrombin induces the proliferation of rat EPR through increased expression of cyclin D1-mediated activation pathway PI3K/PDK1/Akt, the cPKC and MAPK ERK1-2, 2) thrombin promotes biphasic c-Fos expression, and 3) the sustained stimulation with thrombin is required to induction of cyclin D1 expression and proliferation in rat RPE cells. Since cyclin D1 is required for cell cycle progression and is considered a link between external mitogenic signals and cell cycle, our results help to clarify the mechanisms involved in development proliferative diseases in EPR, definition required for the design of therapeutic procedures to prevent fibroproliferative diseases, such as the VRP and cancer.

## **1. Introducción**

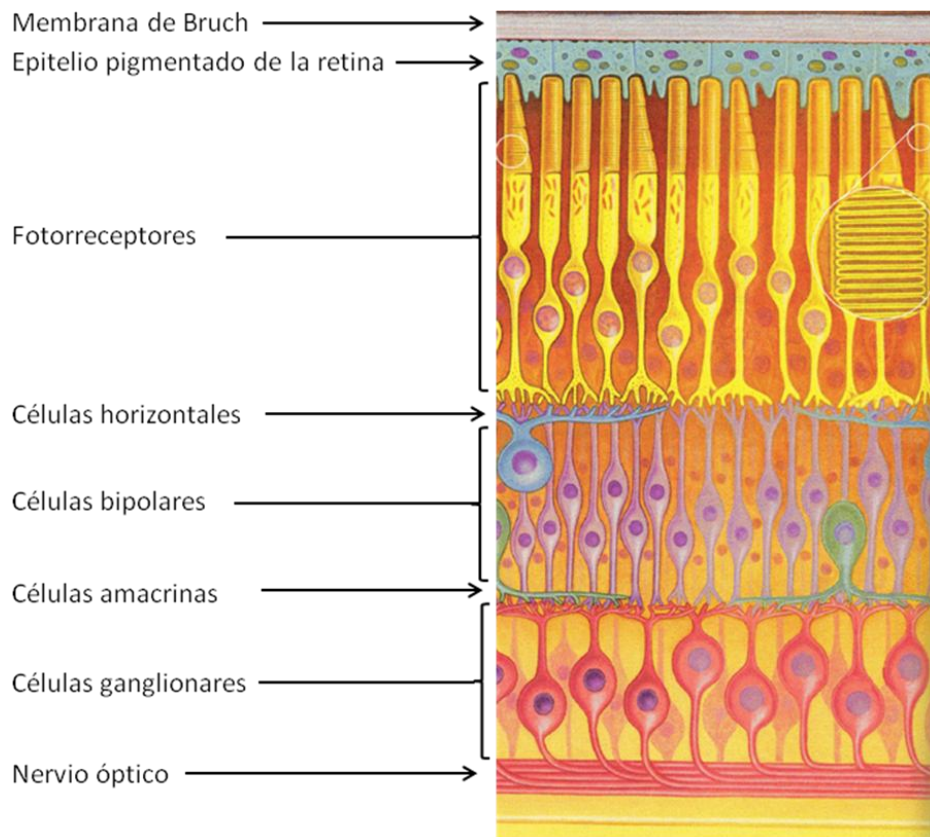
### *1.1. La retina y el epitelio pigmentado de la retina (EPR)*

La luz ha permitido el desarrollo de estructuras visuales en la mayoría de los animales y en el caso de los vertebrados el proceso de la visión inicia en la retina. La retina es la región fotosensible del ojo y se localiza en la parte posterior de éste. La luz pasa a través del ojo y proyecta una imagen en la retina. En el interior del ojo, la córnea y el cristalino enfocan la luz que atraviesa el humor vítreo y llega hasta la retina que se encuentra adosada al epitelio pigmentado de la retina (EPR) que recubre el fondo del ojo (Clack, 1986; Fernald, 2004).

La retina es un tejido nervioso estratificado, formado por un número reducido de tipos celulares. En la retina existen cinco tipos neuronales: fotorreceptores, células bipolares, células ganglionares, células horizontales y células amacrinas, además de dos clases de células gliales: las células de Müller y los astrocitos (Fig. 1). La información se transmite en sentido vertical desde los fotorreceptores hasta las células ganglionares cuyos axones forman el nervio óptico que conduce la información visual hasta los centros superiores de integración. La retina tiene dos capas llamadas plexiforme externa, donde se pasa la información de los fotorreceptores a las células bipolares y plexiforme interna, en la que establecen sinapsis las células bipolares con las ganglionares. Las células horizontales y amacrinas son interneuronas que modulan la información que se transmite en las capas plexiforme externa e interna, respectivamente (Swaroop et al., 2010).

Los fotorreceptores se dividen en dos clases: los conos y los bastones. Los conos se activan sólo con luz brillante e intensa; son los responsables de la visión en color y se subdividen en tres tipos dependiendo del pigmento que poseen, confiriéndoles cada uno de ellos la sensibilidad específica a la luz de cierta longitud de onda. Los bastones poseen un solo pigmento visual, la rodopsina y son los responsables de la visión en la oscuridad. En los fotorreceptores se distinguen dos regiones: el segmento externo que contiene discos de membrana formados, principalmente, por pigmentos fotosensibles, y el segmento interno, en el que se localizan los organelos celulares así como las terminales sinápticas que conectan con las células bipolares y horizontales. En los conos y bastones se lleva a cabo el fenómeno de la fototransducción que es la transformación de la energía luminosa en energía química que se traduce en la liberación de un neurotransmisor de la terminal sináptica (Swaroop et al., 2010; Wallace, 2011).

Las células gliales de la retina son los astrocitos, semejantes a los de otras regiones del sistema nervioso, y la glía de Müller, un tipo de glía radial que interviene en el mantenimiento del ambiente iónico, en interacciones metabólicas, en la barrera hematorretiniana y en la modulación de la transmisión sináptica entre las neuronas (Wallace, 2011).



**Fig. 1. Estructura de la retina.** En la imagen se muestran los distintos tipos de celulares que conforman la retina.

Adicionalmente a las funciones realizadas por las células gliales, el correcto funcionamiento y mantenimiento de la retina neural requiere de la interacción directa con el EPR, el cual es un tejido esencial que provee a la retina de soporte metabólico y funcional. Entre otras funciones el EPR absorbe la luz dispersada, con lo que protege a los fotorreceptores del daño fótico, participa en el transporte transepitelial, fagocita los segmentos externos de los fotorreceptores, mantiene la adhesión retinal, secreta factores de crecimiento y forma parte de la barrera hematorretiniana (Strauss, 2005). Debido a la estrecha relación entre las células del EPR y la retina neural se ha sugerido que la alteración de cualquiera de las funciones del EPR puede conducir al daño retinal y,

en consecuencia, a la ceguera (Strauss, 2005; Swaroop et al., 2010). Entre otras, las distrofias retinianas, las enfermedades coroidales y los desórdenes del tipo fibro-proliferativo son algunas de las patologías que se asocian a la alteración del EPR y de su funcionamiento (Pastor et al., 2002; Simo et al., 2010; Sparrow et al., 2010; Strauss, 2005). Particularmente se ha demostrado que las células del EPR tienen la capacidad de proliferar y migrar como respuesta a un daño y se ha sugerido que esta capacidad regenerativa puede generar efectos adversos como ocurre en la vitreorretinopatía proliferativa (VRP). La VRP es un padecimiento que resulta de un proceso de cicatrización inapropiado y tiene como resultado la formación de membranas colágeno-celulares contráctiles sobre ambas superficies de la retina, provocando el desprendimiento de la retina y, en consecuencia, ceguera (Pastor et al., 2002; Strauss, 2005).

#### *Características morfológicas*

El EPR es un tejido compuesto por una monocapa de células poligonales que se localiza entre la retina neural y la coroides, una estructura vascular densamente empacada (Sparrow et al., 2010; Strauss, 2005). En el desarrollo embrionario el EPR se origina a partir de las vesículas ópticas formadas por el neuroectodermo. Las vesículas ópticas también dan lugar a la retina neural, por lo que, la estrecha relación entre el EPR y la retina neural se genera desde el desarrollo embrionario (Fuhrmann, 2010). Las células del EPR reciben su nombre gracias a la presencia de gránulos citoplasmáticos de melanina, llamados melanosomas y se considera que la diferenciación de estas células requiere la expresión de la tirosinasa, enzima encargada de la formación de melanina a partir de L-tirosina (Sparrow et al., 2010).

Las células del EPR están polarizadas y presentan un dominio apical y un dominio baso-lateral. A diferencia de la mayoría de los epitelios, el EPR interactúa con la retina neural por medio del dominio apical, mientras que la cara baso-lateral se orienta hacia la coroides. La interacción del EPR con la retina neural es a través de numerosas microvellosidades que recubren parcialmente a los segmentos externos de los fotorreceptores. La cara baso-lateral está en contacto directo con un tejido conectivo acelular, llamado membrana de Bruch, el cual separa al EPR del endotelio fenestrado de la coroides (Strauss, 2005).

La adhesión intercelular y la estructura epitelial en monocapa del EPR se mantienen debido a las uniones adherentes (*zonula adherens*) y desmosomas presentes entre células contiguas del EPR. Adicionalmente, cerca de la región apical se ubica la *zonula occludens*, formada por uniones

estrechas, las cuales contribuyen al establecimiento de la polaridad epitelial, al regular la distribución asimétrica de proteínas y lípidos entre los dominios apical y baso-lateral. Otra consecuencia importante de las uniones estrechas formadas del EPR es que permiten a este tejido formar la parte externa de la barrera hematorretiniana (Strauss, 2005).

### *Características funcionales*

Como ya se ha mencionado antes el EPR realiza funciones esenciales para el mantenimiento de la función visual, entre las que destacan:

1. Absorción de la energía luminosa. La melanina contenida en el EPR absorbe el exceso de luz que llega al fondo del ojo, lo que evita el reflejo de la luz en el fundus e incrementa la calidad visual, además de proteger a los fotorreceptores de daño por foto-oxidación (Strauss, 2005).
2. Participación en el ciclo visual. La interacción del EPR con los fotorreceptores en el ciclo visual es esencial, ya que permite regenerar el cromóforo 11-*cis*-retinal, el cual forma parte de la rodopsina, proteína encargada de la fototransducción. La luz causa la activación de la rodopsina y la isomerización del 11-*cis*-retinal en all-*trans*-retinal, el cual se reduce en los fotorreceptores a all-*trans*-retinol y es transportado hacia el EPR, donde a través de la catálisis de la isomerasa RPE65 (enzima específica de este tejido) se regenera el 11-*cis*-retinal; una vez regenerada esta molécula es enviada nuevamente a los fotorreceptores, donde se une nuevamente a la opsina (Sparrow et al., 2010).
3. Fagocitosis de los segmentos externos de los fotorreceptores. Los segmentos externos de los fotorreceptores están constituidos por un sistema de discos membranosos que contienen a la rodopsina y que están constantemente expuestos a la luz y al oxígeno, lo que promueve la formación de radicales libres y el daño de sus componentes proteicos y lipídicos; por lo anterior, los segmentos externos de los fotorreceptores se renuevan constantemente, lo que desplaza a los discos viejos hacia la punta de los fotorreceptores, donde se desprenden y son fagocitados y digeridos por el EPR (Strauss, 2005).
4. Adhesión retinal. La adhesión de la retina neural al EPR es esencial para la función visual y se genera a través de la inter-digitación de las microvellosidades de la cara apical de las células del EPR con los segmentos externos de los fotorreceptores (Strauss, 2005).

5. Mantenimiento del ojo como un sitio inmunológicamente privilegiado. El EPR expresa de manera constitutiva moléculas inmunosupresoras y debido a la formación de uniones estrechas entre células contiguas de este tejido constituye la parte externa de la barrera hematorretiniana, lo que impide el acceso de células sanguíneas y proteínas plasmáticas al interior del ojo (Holtkamp et al., 1999; Ishida et al., 2003; Runkle and Antonetti, 2011; Usui et al., 2008).
6. Síntesis y secreción de factores de crecimiento. El EPR secreta una gran variedad de moléculas que se requieren para mantener la integridad estructural de la retina y modular la respuesta a un daño. Particularmente, la secreción de factores de crecimiento promueve la protección de las células de la retina neural contra el daño por la excitotoxicidad del glutamato o por hipoxia (Simo et al., 2010).

### *1.2. Trombina*

La trombina es una glicoproteína representativa de la subclase de proteasas que se caracterizan por tener una serina en el sitio activo de la enzima. La trombina es sintetizada en el hígado y secretada a la circulación general como una proteína compleja inactiva llamada protrombina. La trombina se activa por proteólisis como consecuencia de daño vascular y la posterior activación de la cascada de coagulación (Davie and Kulman, 2006). La trombina tiene diversos efectos biológicos, entre ellos, interviene en la coagulación, donde se considera el elemento más importante de la cascada de coagulación, debido principalmente a que puede actuar como un potente procoagulante o anticoagulante según las proteínas con las que interactúe (Bode, 2006). La trombina interactúa con alta especificidad con una amplia variedad de proteínas que pueden ser sus propios sustratos, cofactores, inhibidores, moduladores o receptores (Bode, 2006). Además de la importancia dentro de la cascada de coagulación la trombina favorece la agregación plaquetaria, estimula la secreción de factores de crecimiento en distintos tipos celulares, activa la angiogénesis e induce la proliferación de distintos tipos celulares (Davie and Kulman, 2006; Narayanan, 1999; Tsopanoglou and Maragoudakis, 2004).

#### *Fenómenos regulados por la trombina*

En distintos tipos celulares la trombina induce el incremento de la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  y del trifosfato de inositol (IP3) e inhibe la producción del monofosfato de adenosina cíclico



(cAMP) (Coughlin, 2000). En células de músculo liso de la tráquea, la trombina induce la activación de la fosfolipasa C  $\beta$  (PLC $\beta$ ), aumento del IP3 y del Ca<sup>2+</sup> intracelular, causando como consecuencia la activación de la proteína cinasa C (PKC), de la fosfatidil inositol-3 cinasa (PI3K) y de las cinasas dependientes de calcio/calmodulina (CaMKs), la activación de dichas cinasas promueve la activación de la vía de señalamiento de las cinasas activadas por mitógenos (MAPKs) e induce la proliferación celular (Lin et al., 2001). En células de cáncer de colon, la trombina puede actuar como factor de crecimiento a través de la activación de PAR1 y la vía de las MAPKs (Darmoul et al., 2003). En el Sistema Nervioso Central (SNC) se ha detectado la presencia de los PARs (Moller et al., 2006) y se sabe que la trombina genera cambios en la morfología de neuronas y astrocitos, induce proliferación glial e incluso puede tener efectos neuroprotectores o neurotóxicos dependiendo de la concentración en que es aplicada (Wang and Reiser, 2003). Adicionalmente se ha sugerido que la actividad proteolítica de la trombina también está implicada en el desarrollo del sistema nervioso (Narayanan, 1999). Otros fenómenos celulares en los que se ha demostrado la participación de la trombina son la agregación plaquetaria, la angiogénesis, la progresión tumoral, las respuestas inflamatoria e inmune, la quimiotaxis y la sobrevivencia celular (Henrikson et al., 1999; Kumar et al., 2009; Macfarlane et al., 2001; Nierodzik and Karparkin, 2006).

La trombina puede actuar como mitógeno, ya que promueve proliferación en células de glía de la retina después de la ruptura de la barrera hematorretiniana (Puro *et al.*, 1990), mientras que en neuronas corticales de rata la estimulación con trombina promueve la expresión de la ciclina D1 y de la ciclina E, componentes indispensables de la progresión del ciclo celular (Rao et al., 2007b). En células de músculo liso y fibroblastos de hámster chino de la línea IIC9 la trombina también genera el aumento en la expresión de la ciclina D1 y promueve la proliferación celular (Gardner *et al.*, 2002; Goel *et al.*, 2002; Tsang *et al.*, 2002). La trombina no solo induce la expresión de la ciclina D1 en diversos tipos celulares, adicionalmente induce la expresión de la cinasa dependiente de ciclina 4 (CDK4) en células de la línea IIC9 y en neuronas corticales. Más aún, la trombina induce la formación del complejo ciclina D1/CDK4 y la activación de la CDK4 como consecuencia (Goel et al., 2002; Rao et al., 2007b).

#### *Receptores activados por proteasas (PARs)*

Existe evidencia de que las proteasas de serina pueden comportarse como moléculas de señalamiento que regulan múltiples procesos celulares mediante la activación de receptores

específicos. En la actualidad se conocen tres tipos de receptores para proteasas de serina. Los primeros dos tipos son receptores para el factor de coagulación Xa y la urocinasa, los cuales son receptores de un solo dominio transmembranal y receptores asociados a inositoles glicosilados, respectivamente, sin embargo, estos receptores no requieren de actividad proteolítica para su activación.

El tercer tipo de receptores, a diferencia de los anteriores, sí requiere de la actividad de la proteasa que los activa. Estos receptores son los de la familia de receptores activados por proteasas (PARs), los cuales son proteínas de siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G (GPCR). Los PARs son activados por proteólisis específica del extremo N-terminal extracelular, lo que genera un nuevo extremo N-terminal previamente enmascarado, el cual interactúa de manera específica con un dominio extracelular y un dominio transmembranal del mismo receptor cortado. Este nuevo extremo N-terminal actúa como ligando e induce un cambio conformacional del receptor, lo cual genera la interacción con la proteína G acoplada a la cara intracelular, activándola como resultado final (Coughlin, 2000; Dery et al., 1998).

Actualmente se conocen 4 miembros de la familia de los PARs. De manera farmacológica se pueden distinguir de acuerdo a la susceptibilidad relativa para ser activados por las proteasas de serina (trombina y tripsina, principalmente). Se sabe que la trombina puede activar a PAR1, PAR3 y PAR4, mientras que la tripsina activa preferencialmente a PAR2. Adicionalmente a la especificidad con las que las proteasas activan a cada uno de los PARs las secuencias de los extremos N-terminal desenmascarados que activan a cada subtipo de estos receptores es distinta, esto constituye la característica molecular más importante para distinguir a cada uno de los subtipos de los PARs. La diferencia entre las secuencias que actúan como ligando de estos receptores ha permitido el desarrollo de péptidos que mimetizan el efecto de dichos extremos N-terminal desenmascarados, los cuales sirven como agonistas para los PARs y han permitido el estudio de los efectos específicos de cada uno de los receptores (Hollenberg and Compton, 2002). Además de la distinción farmacológica, los PARs se pueden distinguir de manera molecular mediante el estudio y clonación de su secuencia. Estas características han permitido determinar que solo existen 4 subtipos de PARs descritos hasta este momento. PAR 1 es el más estudiado de los PARs y se sabe que puede estar acoplado a proteínas  $G_{12/13}$ ,  $G_q$  o  $G_i$  (Coughlin, 2000). Las proteínas G asociadas a PAR2, PAR3 y PAR4 se desconocen pero se sabe que PAR2 y PAR4 estimulan la producción de fosfoinosítidos (Hollenberg and Compton, 2002; Hollenberg and Houle, 2005).

## *PAR1*

Se sabe que la mayor parte de los efectos celulares de la trombina dependen de la activación de PAR1 y debido a que se conocen las proteínas G que están asociadas a este receptor, se ha demostrado mediante diversos estudios que la activación de PAR1 dispara el señalamiento de distintas vías. Se sabe que PAR1 puede estar acoplado a la proteína  $G_{12/13}$ , la cual activa a la proteína G pequeña Rho por un mecanismo dependiente de la activación de proteínas intercambiadoras de nucleótidos de guanina (GEF). La activación de Rho y de sus efectores se ha asociado principalmente al cambio en el citoesqueleto y por consiguiente al cambio en la forma celular, principalmente (Macfarlane et al., 2001).

Por otra parte se ha observado que la estimulación con trombina en distintos tipos celulares puede conducir al aumento en la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  y de DAG, conduciendo a la activación de varias isoformas de las PKC, cuya activación controla la activación de otras vías de señalamiento y diversos factores de transcripción que conducen a la proliferación y a otros fenómenos celulares. La forma en la que PAR1 puede promover el aumento en el  $Ca^{2+}$  y en el DAG intracelular es mediante la activación de la PLC $\beta$  dependiente de la subunidad  $\alpha$  de la proteína  $G_q$ . PAR1 también está acoplado a la proteína  $G_i$ , la cual a través de la inhibición de la adenilil ciclasa promueve la disminución de los niveles de AMP cíclico, segundo mensajero importante y activador de la proteína cinasa A (Macfarlane et al., 2001).

Lo anterior demuestra que la activación de PAR1 inducida por la trombina puede disparar el señalamiento de distintas vías dentro de la célula, las cuales afectan de manera importante a diversos fenómenos celulares. Este trabajo se enfoca en el análisis de la activación dependiente de la trombina y de los PARs de vías de señalamiento que modulan la proliferación en distintos tipos celulares.

### *1.3. Trombina y proliferación*

Estudios en distintos tipos celulares han demostrado que la trombina se puede comportar como mitógeno e induce la expresión de proteínas clave en la regulación del ciclo celular (Davie and Kulman, 2006). Se sabe que la trombina promueve proliferación en células de glía de la retina después de la ruptura de la barrera hematorretiniana (Puro et al., 1990), mientras que en neuronas corticales de rata la estimulación con trombina promueve la expresión de las ciclinas D1 y E, componentes indispensables de la progresión del ciclo celular (Rao et al., 2007b). En células de

músculo liso y fibroblastos de hámster chino de la línea IIC9 la trombina también genera aumento en la expresión de ciclina D1 y promueve proliferación (Gardner et al., 2002; Goel et al., 2002; Tsang et al., 2002). La trombina no solo induce la expresión de la ciclina D1 en diversos tipos celulares, sino también induce la expresión de la CDK4 en células de la línea IIC9 y en neuronas corticales. Además la trombina induce la formación del complejo ciclina D1/CDK4 y la activación de la CDK4, teniendo como consecuencia la progresión del ciclo celular (Goel et al., 2002; Rao et al., 2007b).

La trombina induce el aumento en la concentración de varias proteínas que controlan la progresión del ciclo celular mediante la activación de factores de transcripción implicados en la proliferación. Se sabe que la trombina promueve la expresión de la proteína c-Fos a través de una vía dependiente de  $Ca^{2+}$  en células endoteliales de la línea HUVEC (Liu et al., 2004). En fibroblastos de la línea CCL39 se ha observado que la trombina induce la activación de las MAPK reguladas por señales extracelulares 1 y 2 (ERK1/2) y esto tiene como consecuencia el aumento en la expresión de c-Fos y c-Jun, lo cual induce la activación del factor de transcripción llamado proteína activadora 1 (AP-1) y esto a su vez promueve la expresión de ciclina D1 y la progresión del ciclo celular (Guo et al., 1997). La trombina también induce proliferación por un mecanismo dependiente de la expresión de c-Fos en células del músculo liso vascular de ratón, células mesangiales humanas y megacarioblastocitos de leucemia humana (Dorn and Davis, 1992; Liu et al., 2000; Paris and Pouyssegur, 1991; Xu et al., 2006a; Xu et al., 2006b).

Estudios con fibroblastos de la línea IIC9 (Keenan et al., 2004) han demostrado que la trombina también puede inducir la activación del factor de transcripción E2F. La activación de E2F inducida por la trombina es consecuencia de la expresión de las ciclinas D y E que al unirse a las CDK4 y CDK2 respectivamente, promueven la fosforilación de la proteína Rb y la consecuente liberación y activación de E2F. La activación del factor de transcripción E2F tiene como consecuencia la progresión irreversible del ciclo celular, sin embargo la transición entre las fases G1, S, G2 y M es controlada por distintos tipos de complejos ciclina/CDK (Schwartz and Shah, 2005).

Van Obberghen-Schilling y colaboradores (1985) demostraron que la trombina estimula eventos bioquímicos implicados en la respuesta mitogénica en fibroblastos de la línea CCL39, dentro de los cuales se destaca el incremento en la expresión del factor de transcripción c-Myc. La consecuencia del incremento en la expresión de c-Myc en dichas células es la progresión del ciclo celular (Van Obberghen-Schilling et al., 1985). Dorn y Davis (1992) demostraron que la trombina es capaz de

inducir un aumento en la expresión de c-Fos y c-Myc en megacarioblastocitos y que dicha expresión podría tener como consecuencia la proliferación y diferenciación de megacariocitos, así como la formación de plaquetas.

Otro factor transcripcional implicado en la progresión del ciclo celular cuya expresión es regulada de manera positiva por la trombina es la proteína de unión al elemento de respuesta al AMP cíclico (CREB). La estimulación de células del músculo liso vascular con trombina tiene como consecuencia la fosforilación y activación de CREB, dicha activación es llevada a cabo por las MAPKs ERK1/2 y p38 (Tokunou et al., 2001). La activación de CREB por trombina induce el aumento de la expresión de c-Fos y de la síntesis de ADN en estas células (Tokunou et al., 2001).

En células del epitelio pigmentado de la retina (EPR) de bovino la trombina estimula la proliferación (Hackett et al., 1991), sin embargo los mecanismos moleculares por los cuales se induce dicha proliferación no ha sido explorado en estas células. Recientemente en nuestro laboratorio se demostró que la trombina induce aumento en la expresión de la ciclina D1 en células del EPR de rata como resultado de la activación de PAR1 y dos distintas vías que involucran, por un lado la activación de la MAPK ERK1/2 por un mecanismo dependiente de PI3K/PKC $\zeta$ , y por otro lado la activación de las PKCs convencionales. Ambas vías convergen en la inducción de la expresión del factor de transcripción c-Fos que regula expresión de la ciclina D1. Finalmente, el aumento en la expresión de la ciclina D1 promueve la progresión del ciclo celular y, consecuentemente, la proliferación de estas células (Palma-Nicolas et al., 2008a; Parrales et al., 2010). Estos y otros trabajos demuestran que la trombina estimula la proliferación como consecuencia de la activación de distintas vías de señalamiento y factores de transcripción.

#### *1.4. Ciclo celular*

El ciclo celular es un proceso ordenado que permite a la célula controlar la replicación de su material genético y su división (Schwartz and Shah, 2005). El ciclo celular eucarionte se divide en cuatro fases: la fase de mitosis (M) en donde ocurre la división celular; la fase G1 en la cual la célula comienza la síntesis de las proteínas requeridas durante el proceso de replicación del ADN; S, fase en la que la célula realiza la replicación; y la fase G2 que permite a la célula expresar las proteínas necesarias para la división celular que se llevará a cabo posteriormente en la fase M (Beier et al., 1999; Schwartz and Shah, 2005).

La compleja organización del ciclo celular no solo permite decidir a la célula si va a replicarse o si por el contrario se mantendrá en un estado no proliferativo o quiescente, sino que controla el destino proliferativo de la célula censando señales extracelulares durante la fase G1 (Yang *et al.*, 2006). Durante G1 la célula puede recibir información externa, integrarla y determinar si inicia la transición hacia la fase S. Una vez iniciada la transición a S la replicación de la célula debe concluir (Blagosklonny and Pardee, 2002). El nexo entre las señales externas y la progresión del ciclo celular se produce debido a las ciclinas (Beier *et al.*, 1999; Schwartz and Shah, 2005; Yang *et al.*, 2006).

#### Ciclinas y cinasas dependientes de ciclinas (CDKs)

La progresión del ciclo celular promovida por la estimulación mitogénica está mediada por los complejos formados por las ciclinas y las Cinasas Dependientes de Ciclinas (CDKs). Las ciclinas son proteínas de vida media corta que pueden regular la actividad de las CDKs. Las CDKs son cinasas de vida media más larga que pueden inhibir a represores de la progresión del ciclo celular por una parte y por otra activar a factores de transcripción que promueven la proliferación (Blagosklonny and Pardee, 2002). Se sabe que las ciclinas controlan la activación de las CDKs y se considera que también podrían controlar su localización subcelular, su especificidad por el sustrato y la interacción con otras proteínas reguladoras (Lukas *et al.*, 1994).

Las ciclinas D1, D2 y D3 regulan el inicio del ciclo celular durante la fase G1 al unirse a las CDKs 4 y 6 (Blagosklonny and Pardee, 2002). La ciclina D1 juega un papel central en la regulación de la proliferación ya que constituye el nexo entre las señales mitógenicas externas y la progresión del ciclo celular (Yang *et al.*, 2006). Se ha demostrado que los niveles de expresión de ciclina D1 se modifican por la activación de receptores para factores de crecimiento. La regulación de la expresión de la ciclina D1 es resultado de la producción y estabilización de su ARN mensajero, así como de la síntesis, estabilización, localización y asociación de la proteína (Aktas *et al.*, 1997).

A lo largo del ciclo celular cambia la expresión de las ciclinas y con ello se modifica la formación de los complejos ciclina/CDK, lo cual tiene como consecuencia la activación e inactivación de los distintos tipos de CDKs. La progresión del ciclo celular se inicia con la formación del complejo ciclina D1/CDK4 o 6, esto tiene como consecuencia la activación de la CDK4 o la CDK6, cuya principal función es la fosforilación de la proteína retinoblastoma (Rb) y por lo tanto la liberación y activación del factor de transcripción E2F (Beier *et al.*, 1999; Schwartz and Shah, 2005). La activación del factor de transcripción E2F tiene como consecuencia la progresión irreversible del

ciclo celular, sin embargo la transición entre las fases G1, S, G2 y M es controlada por distintos tipos de complejos ciclina/CDK (Schwartz and Shah, 2005).

La transición entre la parte final de la fase G1 y el inicio de la fase S está regulada por la formación del complejo ciclinaE/CDK2 (Schwartz and Shah, 2005). El complejo ciclina E/CDK2 también es capaz de fosforilar a Rb y de esta manera mantener activo a E2F (Schwartz and Shah, 2005). Durante el inicio de la fase S la ciclina A comienza a expresarse de manera notable y desplaza a la ciclina E para interactuar con la CDK2. La formación del complejo ciclina A/CDK2 perdura durante la fase S (Schwartz and Shah, 2005). Durante la fase G2 se mantiene la expresión de la ciclina A, sin embargo, se une a otra CDK distinta con el nombre de cdc2. El complejo ciclina A/cdc2 participa en la regulación de la expresión de proteínas que serán necesarias durante la fase M (Blagosklonny and Pardee, 2002). Hacia el final de la fase G2, cdc2 se une a la ciclina B. La formación del complejo ciclina B/cdc2 marca el final de la fase G2 y el inicio de la fase M (Blagosklonny and Pardee, 2002). Posterior a la división celular se forma el complejo ciclina C/CDK3, el cual se mantendrá presente en la célula durante el inicio de la fase G1 previo a la expresión del complejo ciclina D1/CDK4 o 6 (Beier *et al.*, 1999; Blagosklonny and Pardee, 2002).

#### *Ciclina D1*

La expresión de la ciclina D1 aumenta de manera rápida por la acción de factores de crecimiento, nutrientes o estímulos mitogénicos. La interacción de factores de crecimiento con sus receptores puede conducir a la activación de vías de señalamiento tales como la vía de Ras y tener como consecuencia un aumento rápido y sostenido de la expresión de ciclina D1 (Yang *et al.*, 2006). Este aumento en los niveles de expresión de la ciclina D1 puede tener como consecuencia el “compromiso” de la célula a proliferar y a partir de ese momento no requerir ninguna señal externa para continuar con la progresión del ciclo celular (Beier *et al.*, 1999; Blagosklonny and Pardee, 2002). Una vez que la célula ha iniciado, de manera irreversible, la transición a través del ciclo celular se conoce como punto de restricción y se presenta durante la fase G1 (Blagosklonny and Pardee, 2002).

### *1.5. Vías de señalamiento involucradas en la proliferación celular*

#### *Cinasas activadas por mitógenos (MAPK)*

Las MAPK son una familia de cinasas de serina/treonina de expresión ubicua que participan en la proliferación, la diferenciación, la transformación, el desarrollo, la respuesta al estrés y la apoptosis (Rozengurt, 2007). Las MAPK se dividen en tres subfamilias, las cuales son: la vía de ERK1/2, las cinasas del extremo N-terminal de Jun (JNK) y las cinasas p38. Particularmente la activación de ERK1/2 se considera un paso crucial para la proliferación en distintos tipos celulares (Pearson et al., 2001).

En diversos estudios se ha demostrado que la activación de los GPCR dispara el señalamiento a través de la vía de las MAPK ERK1/2. Existen diversos mecanismos por los que los GPCR pueden activar la vía de las MAPK ERK1/2. Las proteínas G triméricas unidas a la cara intracelular de los GPCR se disocian después de la activación de dichos receptores, generando el señalamiento por una parte de las subunidades  $\alpha$  y por otra de las subunidades  $\beta\gamma$ . El señalamiento inducido por las subunidades  $G_{s\alpha}$  induce la activación de las MAPK ERK1/2 como consecuencia de la activación de la proteína cinasa A (PKA) o por un mecanismo dependiente de Epac, un factor intercambiador de nucleótidos de guanina de Ras (RAS-GEF) activado por AMP cíclico (de Rooij et al., 1998). Las subunidades  $G_{q\alpha}$  promueven el aumento en la concentración de DAG y  $Ca^{2+}$ , a través de la activación de la PLC $\beta$ . El aumento en la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  activa a la CAMKII, la cual fosforila e inhibe a la proteína activadora de la GTPasa Ras (RAS-GAP), induciendo la activación de Ras (Chen et al., 1998). El aumento en la concentración de DAG y  $Ca^{2+}$  también promueve la activación de las PKC convencionales y, en consecuencia, la activación de las MAPK por medio de la vía PYK2-Grb-SOS-Ras (Kolch et al., 1993).

Ras es una proteína G pequeña que induce la activación de Raf. Un vez activa Raf promueve la actividad de las cinasas duales MEK1/2, las cuales fosforilan a las MAPK ERK1/2 en los residuos de tirosina 204 y treonina 202. La fosforilación de las MAPK ERK1/2 promueve su actividad y translocación al núcleo, lo que tiene como consecuencia la activación de diversos factores de transcripción importantes en el control de la proliferación (Chang et al., 2003; Roux and Blenis, 2004).

Otro mediador importante entre la activación de los GPCR y las MAPK ERK1/2 es la PI3K, la cual es activada por las subunidades  $G_{\beta\gamma}$  y promueve la activación de las MAPK ERK1/2 por un mecanismo



independiente de Ras que involucra la activación de la PKC $\zeta$ , dicha activación induce la actividad de la vía Raf-MEK1/2-ERK1/2 (Takeda et al., 1999).

El papel de la activación de las MAPK ERK1/2 en el control de la proliferación ha sido analizado de manera extensiva en condiciones fisiológicas y fisiopatológicas. Estudios con fibroblastos de la línea NIH3T3 demostraron que la activación de ERK promueve la expresión de la ciclina D1 y la progresión del ciclo celular (Cheng et al., 1998). Se ha demostrado que la activación de ERK1/2 también dispara la actividad transcripcional de NF $\kappa$ B por un mecanismo que involucra la degradación de I $\kappa$ B (Lee and Han, 2008). Estudios con fibroblastos humanos han demostrado que la activación de ERK1/2 se requiere para la expresión de las proteínas c-Fos y c-Jun (Gutierrez-Venegas and Castillo-Aleman, 2008).

Además de la activación del factor de transcripción AP-1 se sabe que ERK1/2 fosforila a la cinasa de serina/treonina P90<sup>RSK</sup>, la cual fosforila y activa al factor de transcripción CREB (Ha and Redmond, 2008; Hecquet et al., 2002).

Resultados de nuestro laboratorio demuestran que la trombina induce la activación de las MAPK ERK1/2 en células de EPR de rata, como consecuencia de la activación de PAR1 y de la vía PI3K-PKC $\zeta$  (Palma-Nicolas et al., 2008a). Adicionalmente se sabe que la trombina induce la activación de las MAPK ERK1/2 en distintos tipos celulares por medio de la activación de los PARs (Borbiev et al., 2003; Cai et al., 2008; Liu et al., 2006; Rossler and Thiel, 2009; Shih et al., 2009). Lo anterior sugiere que la activación de las MAPK ERK1/2 inducida por la trombina es un fenómeno crucial en la inducción de la proliferación promovida por esta proteasa.

#### *Isoformas convencionales de las cinasas de proteínas C (cPKC)*

Las cinasas de proteínas C (PKC) son cinasas de serina/treonina de activación dependiente de lípidos que se dividen en tres subfamilias de acuerdo a la similitud de sus secuencias y a la variabilidad de sus dominios reguladores. Las PKC incluidas en la subfamilia de las convencionales o clásicas son las PKC $\alpha$ , PKC $\beta$ <sub>I</sub>, PKC $\beta$ <sub>II</sub> y PKC $\gamma$  y su activación requiere calcio, fosfolípidos aniónicos y diacilglicerol (DAG), de manera natural, o ésteres de forbol como el TPA de manera farmacológica para su activación completa. Las isoformas pertenecientes a la subfamilia de las PKC nuevas (PKC $\delta$ , PKC $\epsilon$ , PKC $\eta$  y PKC $\theta$ ) a diferencia de las convencionales no requieren de calcio para su activación. La tercera subfamilia está formada por las PKC $\zeta$ , PKC $\lambda$  y PKC $\iota$ , las cuales requieren de fosfatidil serina para su activación (Yu et al., 2007). Adicionalmente se ha descrito la nueva isoforma PKC $\mu$ , la cual

podría pertenecer a la subfamilia de las PKC atípicas de acuerdo con su secuencia (Johannes et al., 1994).

Las PKC constituyen un nexo muy importante entre diversas vías de transducción de señales y participan en la regulación de la proliferación, la diferenciación, la apoptosis y el proceso inflamatorio (Fields et al., 2007). Se sabe que diversos segundos mensajeros de tipo lipídico activan a distintos miembros de la familia de las PKC, sin embargo, el mecanismo de activación de las PKC convencionales es el mejor estudiado. Las PKC tienen un dominio pseudosustrato en el extremo N-terminal, el cual bloquea el sitio de unión al sustrato e induce la autoinhibición a estas cinasas. La activación de la fosfolipasa C (PLC) induce el aumento en la concentración intracelular de diacilglicerol (DAG) y de 1,4,5- trifosfato de inositol ( $IP_3$ ), a partir de la hidrólisis de los fosfolípidos de inositol presentes en la membrana. El  $IP_3$  es un segundo mensajero que promueve la liberación de calcio de pozas intracelulares. El calcio liberado promueve, entre otros fenómenos, el reclutamiento de las PKC convencionales a la membrana, donde el DAG genera un cambio conformacional que permite la separación del pseudosustrato del sitio catalítico, teniendo como consecuencia la completa activación de las PKC convencionales (Toker, 1998).

Los GPCR pueden inducir la activación de la  $PLC\beta$  por medio de un mecanismo dependiente de las subunidades  $Gq_\alpha$ , esta activación constituye un nexo entre las señales extracelulares y la activación de la vía  $PLC\beta$ -PKC convencionales (Muallem, 1989).

Se ha demostrado que distintas isoenzimas pertenecientes a la familia de PKC son cruciales en el desarrollo de tumores y en la transformación de células (Fields et al., 2007). Además, se sabe que la activación de las PKC convencionales induce un incremento en los niveles de ARN mensajero y proteína de la ciclina D1 (Li and Weinstein, 2006). Una proteína importante en el control de la proliferación es c-Fos y se sabe que el aumento en la expresión de dicha proteína induce el incremento en la expresión de los genes regulados por el factor de transcripción AP-1, entre ellos el de la ciclina D1. Li y Weistien (2006) demostraron que la activación constitutiva de las PKC convencionales del tipo  $\beta$  promueve la expresión de la ciclina D1 por un mecanismo que involucra el aumento en la expresión de la proteína c-Fos. Adicionalmente sus datos sugieren que la activación de las PKC convencionales juega un papel central en el control de la proliferación en células de cáncer de mama.

Se sabe que la activación de PAR-1 induce aumento en las concentraciones intracelulares de  $IP_3$  y diacilglicerol (DAG) por un mecanismo dependiente de la  $PLC-\beta$  (Coughlin, 2000). El  $IP_3$  induce la

liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ , el cual en conjunto con el DAG promueve la activación de las PKC convencionales. Trabajo en nuestro laboratorio ha demostrado que la activación de las PKC convencionales dependiente de PAR1 promueve la expresión de la ciclina D1 y la proliferación de las células del EPR (Palma-Nicolas et al., 2008a; Parrales et al., 2010). Rossler y cols. (2009) demostraron que la activación de los PARs por trombina promueve la activación de las PKC convencionales en fibroblastos de la línea 39MI-81. Esta activación de las PKC convencionales tiene como resultado el señalamiento de la vía de ERK1/2 y, en consecuencia, la transcripción de genes con elemento de respuesta al suero en su promotor, a través de la activación del factor del complejo ternario (Rossler and Thiel, 2009). La evidencia existente demuestra que la activación de las PKC convencionales inducida por la trombina puede constituir un nexo importante entre la ruptura de la integridad vascular y la proliferación necesaria para la cicatrización.

#### *Cinasa del fosfato de inositol 3 (PI3K) y cinasa de proteína B (PKB/Akt)*

Las cinasas del fosfato de inositol 3 (PI3K) son miembros de una familia de cinasas de lípidos que juegan un papel central en diversas respuestas celulares, tales como sobrevivencia y control de la proliferación (Kong and Yamori, 2008). Las PI3K se clasifican en tres grupos de acuerdo al sustrato que fosforilan y a la homología entre sus secuencias. La activación de las proteínas pertenecientes a la clase I de las PI3K es consecuencia, principalmente, de la activación de receptores con actividad de cinasa de tirosina (RTK) y GPCR (Engelman et al., 2006; Katso et al., 2001; Naor et al., 2000). La activación de las PI3K de la clase IA es dependiente de los RTK y resulta del acoplamiento con proteínas adaptadoras que unen a la subunidad reguladora de las PI3K con los residuos de fosfotirosina en los RTK activados; esto permite la activación de la subunidad catalítica de las PI3K (Duronio, 2008). En estado activo las PI3K de la clase IA fosforilan el lípido fosfatidilinositol (4,5)-bifosfato (PtdIns 4,5- $\text{P}_2$ ) en la posición 3 del anillo de inositol, generando el fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato (PtdIns 3,4,5- $\text{P}_3$ ) (Whitman et al., 1988).

Adicionalmente a la activación dependiente de los RTK se sabe que los GPCR disparan el señalamiento de la vía PI3K-PDK1-Akt a través de un mecanismo dependiente de las subunidades  $\text{G}_{\beta\gamma}$  y se considera que esta vía es una de las importantes en el señalamiento inducido por  $\text{G}_{\beta\gamma}$  (Naor et al., 2000). Las PI3K de la clase IB también son heterodímeros constituidos por una subunidad catalítica y una subunidad reguladora. Las subunidades reguladoras de las PI3K de la clase IB no se activan por un mecanismo dependiente de los RTK y aunque se desconoce el mecanismo molecular

involucrado en este proceso se sabe que las subunidades  $\beta\gamma$  de las proteínas G triméricas pueden activarlas (Duronio, 2008; Engelman et al., 2006).

Una vez activas, las PI3K de la clase IB inducen un aumento en la concentración celular de PtdIns 3,4,5- $P_3$ , este lípido fosforilado es un importante segundo mensajero. La concentración celular del PtdIns 3,4,5- $P_3$  está regulada por la actividad de la fosfatasa PTEN (fosfatasa y homóloga de la tensina), la cual desfosforila el PtdIns 3,4,5- $P_3$ , terminando su actividad como segundo mensajero. El PtdIns 3,4,5- $P_3$  recluta hacia la membrana y genera un cambio conformacional en la cinasa Akt (también conocida como proteína cinasa B, PKB) a través del dominio de homología con pleckstrina (PH). Este cambio conformacional en Akt expone los residuos de treonina (thr) 308 y de serina (ser) 473, los cuales son fosforilados por la cinasa dependiente del 3-fosfato de inositol (PDK1) y por el complejo 2 del blanco de la rapamicina en mamíferos (mTORC2). La fosforilación de la thr 308 y la ser 473 causa la activación máxima de total Akt (Liang and Slingerland, 2003). Akt es el efector más importante de las PI3K y se considera un regulador fundamental en la proliferación y supervivencia celular (Cheng et al., 2009). En trastornos proliferativos como el cáncer se ha observado que elementos de la vía de la PI3K están alterados y se considera que dicha cinasa y sus efectores juegan un papel clave en la transformación de células y la carcinogénesis (Engelman et al., 2006).

La vía de PI3K-Akt puede regular la proliferación celular a través de la regulación transcripcional de genes implicados en el control del ciclo celular. Se sabe que la vía de PI3K/Akt puede inducir la síntesis de ciclina D1 a través de la activación de factores de transcripción que tienen sitios de reconocimiento y activación en el promotor de la ciclina D1. El promotor de la ciclina D1 tiene sitios de unión para los factores de transcripción AP-1, CREB y el factor nuclear  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B), entre otros (Joyce et al., 2001; Pestell et al., 1999; Toulbi-Abed et al., 2008).

Los niveles de la ciclina D1 son resultado no solo de su síntesis, sino también de su estabilización y degradación, lo cual se regula por su localización sub-celular (Aktas et al., 1997; Liang and Slingerland, 2003). La PI3K promueve la estabilización de la ciclina D1 por un mecanismo que involucra la activación de Akt (Liang and Slingerland, 2003). Se ha demostrado que Akt fosforila e inhibe a la Cinasa de la Sintasa del Glucógeno 3 beta (GSK-3 $\beta$ ). La GSK-3 $\beta$  fosforila en el residuo thr 286 a la ciclina D1 y promueve su translocación al citoplasma por medio de la asociación con el transportador CRM1. La localización citoplásmica de la ciclina D1 induce su ubiquitinación y, en consecuencia, su degradación (Liang and Slingerland, 2003).

Recientemente en nuestro laboratorio se demostró que se requiere de la activación de la PI3K para la expresión de ciclina D1 inducida por la trombina en células del EPR de rata (Parrales et al., 2010). Adicionalmente, se ha demostrado que la trombina puede inducir la activación de la PI3K y que dicha activación es importante en el control de la expresión de citocinas y factores de crecimiento, tales como la interleucina 6 (IL-6), IL-8, el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF). Estudios con células de músculo liso aórticas de la línea HAoSMC demostraron que la trombina promueve la expresión y liberación de IL-6 por un mecanismo que requiere la activación de la PI3K (Chung et al., 2010). En células de cáncer de próstata la activación de PAR1 promueve la expresión y liberación de IL-8 y VEGF; dicho fenómeno requiere de la activación de la PI3K (Liu et al., 2006). Adicionalmente, existe evidencia que demuestra que la activación de PAR1 promueve la fosforilación en el residuo 308 de Akt y por consiguiente su activación dependiente de PI3K/PDK1 en distintos tipos celulares (Arayatrakoolikit et al., 2008; Feutz et al., 2008; Minhajuddin et al., 2009).

#### *Blanco de la rapamicina en mamíferos (mTOR)*

La proteína llamada blanco de la rapamicina en mamíferos (mTOR) es una cinasa de serina/treonina que regula el crecimiento, la proliferación, la movilidad y la sobrevivencia celular, así como la síntesis de proteínas y la transcripción (Gulhati et al., 2009). mTOR pertenece a la familia de cinasas PI3K y está conservada desde las levaduras hasta los mamíferos (Ma and Blenis, 2009). Se considera que mTOR es un nexo entre el inicio de la síntesis de proteínas y las señales mitogénicas externas, el ambiente extracelular, hormonas y factores de crecimiento (Hay and Sonenberg, 2004; Ma and Blenis, 2009). Recientemente se ha demostrado que mTOR es una cinasa clave en la regulación de la proliferación debido a que induce la traducción de ARN mensajeros específicos que codifican para proteínas cruciales en el crecimiento y la proliferación celular (Ma and Blenis, 2009).

Se han identificado dos complejos proteicos en los que participa mTOR (mTORC1 y mTORC2), el primero de ellos es sensible a rapamicina y está formado por mTOR, la proteína reguladora asociada a mTOR (Raptor), mLST8 y PRAS40; mientras que el complejo 2 está formado por mTOR, la proteína acompañante de mTOR insensible a rapamicina (Rictor), mLST8, Sin 1 y PROTOR (Guertin and Sabatini, 2007).

mTORC1 induce la síntesis de proteínas mediante la fosforilación e inactivación de la proteína de unión al factor de iniciación en eucariontes 4E (4E-BP1), la cual es un represor del factor de iniciación de la traducción en eucariontes (eIF4E). Cuando eIF4E se separa de su represor facilita la

unión del ribosoma con los ARN mensajeros maduros transcritos en el núcleo (Hay and Sonenberg, 2004).

Otro efector importante de la actividad de mTORC1 es la cinasa p70S6 ribosomal (S6K), la cual se requiere para la proliferación celular (Montagne et al., 1999). El mecanismo molecular por el cual la S6K regula la proliferación no ha sido completamente estudiado, sin embargo, el modelo más aceptado involucra la regulación de la traducción de mensajeros específicos que codifican la maquinaria de la traducción, tales como proteínas ribosomales, factores de elongación de la traducción y la proteína de unión a la poli-A (PABP) (Hay and Sonenberg, 2004).

La actividad de mTORC2 juega un papel central en la regulación del crecimiento celular y regula los cambios en el citoesqueleto de actina dependientes del ciclo celular (Gulhati et al., 2009). Adicionalmente se sabe que mTORC2 participa en la regulación de la actividad de Akt, ya que fosforila a dicha cinasa en el residuo de ser 473, lo cual causa la activación completa de Akt (Liang and Slingerland, 2003).

En distintos tipos de cánceres las vías que regulan la activación de mTOR están alteradas y, en consecuencia, la actividad de esta vía también se ve alterada en distintos tipos de tumores (Hay and Sonenberg, 2004). Adicionalmente se sabe que la rapamicina y sus derivados (CCI-779 y RAD001) evitan la proliferación en células deficientes en PTEN o con alta actividad de Akt (Neshat et al., 2001; Podsypanina et al., 2001).

Se sabe que la trombina promueve la activación de mTORC1 por un mecanismo que involucra a PI3K en células endoteliales y periodontales (Arayatrakoollikit et al., 2008; Minhajuddin et al., 2009). La activación de mTORC1 por la activación PI3K inducida por PAR1 puede constituir el nexo entre la trombina y el control de la traducción requerido para la proliferación, por lo que es necesario que en el futuro se analice el efecto de la inhibición de los complejos de mTOR sobre la proliferación inducida por la trombina.

#### *Cinasas dependientes de calcio/calmodulina (CaMKs)*

Las cinasas dependientes de calcio/calmodulina (CaMKs) son cinasas de serina/treonina de expresión ubicua que se activan mediante el aumento en la concentración de  $Ca^{2+}$  y su subsecuente unión con la calmodulina. La actividad de las CaMK está regulada de manera importante por la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$ , sin embargo, las CaMK tienen un mecanismo de autorregulación que permite una actividad sostenida aún después de que el  $Ca^{2+}$  ha regresado a su

nivel basal. Cuando se presenta un incremento inicial en el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular el complejo de  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina se une a la cinasa y promueve su autofosforilación, teniendo como consecuencia un cambio conformacional que libera al sitio catalítico del dominio regulador, permitiendo la actividad de la CaMK por periodos prolongados, aún después de la disociación del complejo  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina (Cai et al., 2008). La activación de las CaMK como resultado del señalamiento disparado por los GPCR es consecuencia de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de pozas intracelulares promovida por el  $\text{IP}_3$  después de la activación de la  $\text{PLC}\beta$  dependiente de las subunidades  $\text{Gq}\alpha$ . Se sabe que el cambio en la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  controla una amplia variedad de fenómenos celulares y esto se debe en gran parte a la activación de las CaMK y la fosforilación de sus sustratos, los cuales están involucrados en el metabolismo, la liberación de neurotransmisores y el control del ciclo celular (Illario et al., 2003).

La progresión del ciclo celular requiere de la interacción entre las ciclinas y las CDKs. Estudios con fibroblastos de ratón de la línea NIH 3T3 han demostrado que la activación de la Cinasa Dependiente de Calcio/Calmodulina-2 (CaMKII) es necesaria para la expresión de ciclina D1 y progresión del ciclo celular (Morris et al., 1998). Sin embargo, no solo la CaMKII participa en la regulación del ciclo celular, se sabe que la activación de la CaMKI tiene un papel central en la formación de los complejos ciclina/CDK, en particular, CaMKI regula la unión entre la ciclina D1 y la CDK4 (Kahl and Means, 2004). Adicionalmente a la regulación directa de la formación de complejos ciclina/CDK, las CaMK pueden controlar la proliferación celular mediante la regulación de proteínas clave en dicho fenómeno. Existe evidencia que sugiere la activación de las MAPK ERK1/2 a través de la activación de Raf-1 por la interacción directa con la CaMKII (Illario et al., 2003).

Se ha observado que la trombina induce la activación de la CaMKII en células endoteliales (Borbiev et al., 2003; Cai et al., 2008). En estos trabajos se ha demostrado que la activación de CaMKII tiene como consecuencia la activación de ERK1/2 y dicha activación se ha relacionado con el rearrreglo del citoesqueleto y un mal funcionamiento en la barrera endotelial. Debido a que se sabe que la activación de las CaMK puede regular la progresión del ciclo celular y que la trombina promueve su activación, induciendo con ello un cambio patológico en células endoteliales es importante analizar el impacto que las CaMK tienen sobre el desarrollo de trastornos proliferativos.

### *Proteína G pequeña Rho*

Las proteínas Rho son una familia de GTPasas pertenecientes a la superfamilia de Ras. Estas proteínas transitan de su forma inactiva unida a GDP a su forma activa unida a GTP, la cual puede interactuar con proteínas blanco y/o efectores específicos (Han et al., 2010). Las GTPasas Rho son proteínas G pequeñas que regulan la dinámica del citoesqueleto en una amplia variedad de eventos morfogénéticos, tales como la migración y la polaridad celular, el tráfico vesicular, la citocinesis y endocitosis; adicionalmente estas GTPasas también participan en el control de la progresión del ciclo celular y la expresión génica, es decir, pueden regular efectos nucleares y citoplásmicos (Pertz, 2010). El cambio entre el estado activo e inactivo de las GTPasas está controlado por moduladores positivos y negativos (Vojtek and Cooper, 1995). En condiciones fisiológicas las GTPasas Rho requieren de factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs) para su activación. Los GEFs pueden actuar como proteínas efectoras de distintos tipos de receptores de membrana (integrinas, caderinas y receptores para factores de crecimiento o para citocinas) y se sabe que constituyen el nexo principal entre la activación de las proteínas  $G_{12/13}$  y la activación de las proteínas Rho (Hurst and Hooks, 2009). Debido a que las GTPasas Rho pueden ser activadas de manera específica por diferentes GEFs se considera que dichas GTPasas son capaces de integrar la información de diferentes vías de señalamiento (Karlsson et al., 2009).

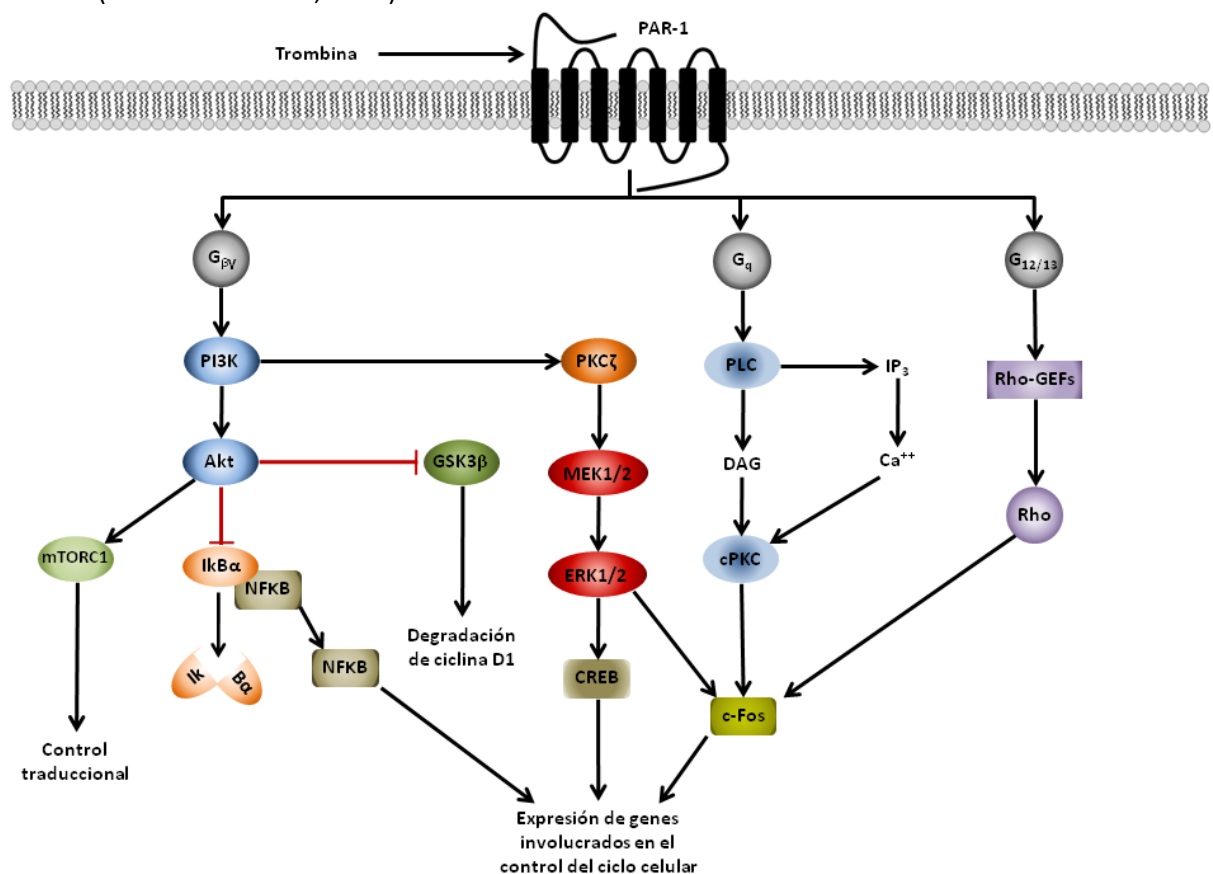
La inactivación de las GTPasas Rho requiere de la hidrólisis del GTP a GDP, sin embargo, la actividad intrínseca de las GTPasas Rho es muy baja, por lo que la función de las proteínas activadoras de las GTPasas (GAPs) es necesaria para permitir la rápida hidrólisis del GTP a GDP y en consecuencia la inactivación de las GTPasas (Hurst and Hooks, 2009). Existen además otros moduladores negativos de la activación de las GTPasas tales como los inhibidores de la disociación de nucleótidos de guanina (GDIs), los cuales evitan la activación de las GTPasas unidas a GDP y bloquean la unión con efectores de las GTPasas activas (Karlsson et al., 2009).

Se sabe que las GTPasas juegan un papel integral en distintos procesos fisiológicos y patológicos. Se ha demostrado que el señalamiento de Rho está alterado en varios tipos de cáncer y las alteraciones en esta vía se han relacionado con el potencial de invasión y metástasis (Schmitz et al., 2000). Existe evidencia que vincula la activación de Rho a la sobrevivencia y progresión del ciclo celular en células cancerosas. La activación de Rac1 y RhoA puede inducir la progresión del ciclo celular mediante el incremento en la concentración de ciclina D1 y la regulación negativa de la expresión de inhibidores de la actividad de las cinasas dependientes de ciclina (Klein et al., 2007;



Villalonga and Ridley, 2006). Aunque las vías involucradas en la expresión de genes reguladores de la progresión del ciclo celular relacionadas con miembros de la familia de Rho no han sido descritas, se sabe que el señalamiento de las GTPasas Rho es necesario para la expresión de genes con elemento de respuesta al suero (SRE) cuando dicha expresión requiere de la activación de proteínas G heterotrimericas (Hill et al., 1995). La expresión de genes con SRE en su promotor es consecuencia de la activación de SRF y del factor del complejo ternario (TCF). Uno de los genes más ampliamente estudiados con SRE es c-Fos. c-Fos es un componente mayoritario del factor de transcripción AP1. Hill y cols. (1995) demostraron que la activación transcripcional plena inducida por el suero y el ácido lisofosfatídico del gen c-Fos requiere de la actividad de las GTPasas RhoA, Rac1 y CDC42.

Recientemente nuestro grupo demostró que la trombina induce la activación de la GTPasa Rho por un mecanismo dependiente de PAR1 en células del epitelio pigmentado de la retina de rata en cultivo (Ruiz-Loredo et al., 2011).



**Fig. 2. Esquema de las vías de señalamiento activadas por la trombina.** La actividad proteolítica de la trombina promueve la activación de PAR-1, induciendo el señalamiento a través de distintas vías intracelulares que tienen como consecuencia la promoción de la proliferación.

## 1.6. Factores de transcripción involucrados en la proliferación celular

### *Factores de transcripción de la familia AP1*

AP-1 es un factor de transcripción dimérico formado por miembros de las familias Fos (c-fos, fos-B, Fra-1 y Fra-2), Jun (c-jun, jun-B y jun-D) y el factor activador de la transcripción (ATF; ATF2, RTF1/ATF3 y B-ATF) implicado en distintos procesos biológicos como diferenciación, proliferación, apoptosis y transformación oncogénica (Shaulian and Karin, 2001; Zenz et al., 2008).

La trombina puede activar la expresión del factor de transcripción Fos a través de una vía dependiente de calcio en células endoteliales de la línea HUVEC (Liu *et al.*, 2004). En fibroblastos de la línea CCL39 se ha observado que la trombina induce la activación de las MAPKs ERK1/2 y esto tiene como consecuencia el aumento en la expresión de c-fos y c-jun, lo cual a su vez promueve la expresión de ciclina D1 y la progresión del ciclo celular (Guo *et al.*, 1997). La trombina también induce proliferación por un mecanismo dependiente de la expresión de c-fos en células del músculo liso vascular de ratón, células mesenquimales humanas y megacarioblastocitos de leucemia humana (Dorn and Davis, 1992; Liu *et al.*, 2000; Paris and Pouyssegur, 1991; Xu *et al.*, 2006a; Xu *et al.*, 2006b). Adicionalmente, se ha demostrado que la activación de la PI3K es necesaria para la expresión de la proteína Fra-1 en células de mesotelioma de la línea MP5 (Ramos-Nino and Littenberg, 2008). En células de osteoblastos de ratón de la línea MC3T3-E1 la activación de la vía PI3K-Akt se requiere para la síntesis de c-fos y c-jun (Wu et al., 2008).

### *Factor nuclear $\kappa$ B (NF $\kappa$ B)*

NF $\kappa$ B es un factor de transcripción heterodimérico constituido por las proteínas Rel-A (p65), Rel-B, c-Rel, NF $\kappa$ B<sub>1</sub> (p50/p105) y NF $\kappa$ B<sub>2</sub> (p52/p110) que tiene un papel central en las respuestas inflamatoria e inmune, en la diferenciación y en la apoptosis (Joyce et al., 2001; Karin and Hunter, 1995). NF $\kappa$ B también induce proliferación y se expresa en la mayoría de las células en forma inactiva unido a la proteína inhibidora I $\kappa$ B $\alpha$  (Joyce et al., 2001). Las proteínas de la familia de NF $\kappa$ B pueden formar homodímeros o heterodímeros, lo que permite una amplia variedad de combinaciones para este factor de transcripción (Sethi et al., 2008). La activación de NF $\kappa$ B se puede dar por una amplia variedad de estímulos, en los que se incluyen citocinas inflamatorias, proteínas virales, agentes citotóxicos, estrés oxidativo, radiación ionizante, ésteres de forbol, ARN de doble cadena y factores de crecimiento (Joyce et al., 2001; Lee et al., 2007; Neumann and Naumann, 2007). En respuesta a la estimulación por factores de crecimiento el complejo de la cinasa IKK se

activa y fosforila a I $\kappa$ B $\alpha$ , promoviendo su ubiquitinación y degradación (Ouyang et al., 2006). El complejo de la cinasa IKK más común está formado por las cinasas IKK $\alpha$  e IKK $\beta$ , así como por el modulador esencial de NF $\kappa$ B (NEMO), también conocida como IKK $\gamma$ . En células no estimuladas NF $\kappa$ B está unido a las proteínas I $\kappa$ B, las cuales tienen sitios que interactúan y bloquean el dominio de unión al ADN y la señal de localización nuclear de NF $\kappa$ B (Joyce et al., 2001). La fosforilación de los residuos ser 32 y ser 36 de I $\kappa$ B $\alpha$  induce su degradación por un mecanismo dependiente del proteosoma y permite la translocación nuclear y activación de NF $\kappa$ B (Neumann and Naumann, 2007).

Se sabe que existen varios genes relacionados con la proliferación celular regulados por NF $\kappa$ B, entre los que destacan factores de crecimiento y proteínas reguladoras del ciclo celular (Sethi et al., 2008). Adicionalmente se ha relacionado a este factor de transcripción con la carcinogénesis y se sabe que su actividad está modificada en distintos tipos de tumores (Lee et al., 2007; Sethi et al., 2008).

Recientemente se ha demostrado que la trombina promueve la activación de NF $\kappa$ B en células epiteliales de pulmón humano (Lin et al., 2006). En fibroblastos de la línea WI-38 se demostró que la trombina induce la activación del complejo de la cinasa IKK, teniendo como consecuencia la fosforilación y degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  (Shih et al., 2009). En este mismo trabajo se demuestra que la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  promovida por la trombina induce la activación de NF $\kappa$ B y la transcripción de genes que están bajo su control. Trabajos con células endoteliales de la línea HUVEC demostraron que la trombina induce la transcripción de genes controlados por NF $\kappa$ B por un mecanismo que involucra a PI3K (Minhajuddin et al., 2009). La evidencia experimental demuestra que la trombina induce la activación de NF $\kappa$ B y se ha sugerido que dicha activación es crucial en la respuesta inflamatoria y cicatrización, procesos que pueden llevar al desarrollo de trastornos proliferativos (Esmon, 2001).

## 2. Planteamiento del problema

La trombina es una proteasa de serina presente en el suero sanguíneo en forma inactiva (protrombina). Como consecuencia de un daño vascular la trombina se activa mediante proteólisis y puede tener diversos efectos celulares además de su participación en la cascada de coagulación (Bode, 2006; Davie and Kulman, 2006). Dichos efectos se deben a la activación de los PARs. Los PARs son receptores de siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G heterotriméricas activados por proteólisis específica del extremo amino-terminal, lo cual genera el desenmascaramiento de un nuevo extremo amino-terminal que actúa como ligando intramolecular e induce la activación del receptor y de la proteína G en la cara intracelular de éste (Coughlin, 2000). Se sabe que la trombina induce el incremento en la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  y de trifosfato de inositol ( $IP_3$ ), así como la activación de distintas isoformas de las PKC, de las CaMKs, de la PI3K y de las MAPKs en distintos tipos celulares (Coughlin, 2000; Macfarlane et al., 2001). Se ha detectado la presencia de los PARs en el sistema nervioso central (Moller et al., 2006) y se ha demostrado que la trombina genera cambios en la morfología de astrocitos e induce proliferación glial (Nicole et al., 2005; Rao et al., 2007a). En neuronas corticales la trombina induce la expresión de ciclinas D1 y E, componentes indispensables de la progresión del ciclo celular (Rao et al., 2007a). En células de EPR de bovino la trombina estimula la proliferación celular (Hackett et al., 1991), sin embargo, los mecanismos moleculares por los cuales induce dicha proliferación no han sido explorados. Las células del EPR forman un epitelio monoestratificado que se localiza entre la retina neural y la coroides, y desempeña una función central en el mantenimiento de la integridad estructural y funcional de la retina neural (Clack, 1986; Mund and Rodrigues, 2006). El EPR es el elemento más importante de la barrera hematorretiniana; interviene en el transporte transepitelial de nutrientes, en la adaptación a la luz y la oscuridad, en el almacenamiento y transformación de los ésteres de la vitamina A, y en el recambio de los segmentos externos de los fotorreceptores (Mund and Rodrigues, 2006). La proliferación descontrolada del EPR puede conducir a la formación de membranas colágeno-celulares características de la Vitreorretinopatía Proliferativa (VRP), las cuales ocasionan desprendimiento de retina y, en consecuencia ceguera (Wilkins and Kulwin, 1979). Dado que la proliferación de las células del EPR es un fenómeno clave en el desarrollo de la VRP y este padecimiento se ha asociado a la ruptura de la barrera hematorretiniana que provoca la interacción de los componentes del plasma sanguíneo con las células del EPR (Nagasaki et al., 1998), entre ellos la trombina, es probable que dicha proteasa

desencadene el desarrollo de la VRP a través de distintos mecanismos moleculares. Aunque se sabe que la trombina induce la proliferación de las células de EPR, no se conocen con claridad los mecanismos moleculares por los que la trombina promueve dicho fenómeno. La identificación y caracterización de las vías involucradas en la proliferación inducida por la trombina en células del EPR generaría información valiosa para la prevención y el desarrollo de nuevas terapias para el tratamiento de trastornos fibroproliferativos en la retina.

### **3. Hipótesis**

La trombina promueve la proliferación en células del EPR de rata a través de la activación de distintas vías de señalamiento, las cuales inducen la progresión del ciclo celular como resultado del aumento de la expresión de ciclina D1.

#### **4. Objetivo**

Determinar los mecanismos moleculares involucrados en el aumento de la expresión de ciclina D1 y en el incremento de la proliferación inducidos por la trombina en las células del EPR de rata en cultivo.

#### **Objetivos particulares**

- Demostrar que la trombina induce aumento de la proliferación de las células del EPR.
- Analizar el efecto de la trombina sobre la expresión de la ciclina D1 en células del EPR.
- Determinar el efecto de la activación de la PI3K, de las MAPKs ERK1/2 y de las PKC convencionales inducida por la trombina sobre la expresión de la ciclina D1 y la proliferación en el EPR.
- Analizar el efecto de la trombina sobre la expresión de la proteína c-Fos en células del EPR.
- Estudiar el efecto de la activación de la PI3K, de las MAPKs ERK1/2, de las PKC convencionales inducida por la trombina en la expresión de c-Fos en células del EPR.
- Analizar si la activación de Akt es requerida para el aumento en la expresión de la ciclina D1 y en la proliferación inducidos por la trombina en células del EPR.
- Estudiar si la inactivación de la cinasa GSK-3 $\beta$  inducida por la fosforilación de Akt se requiere para el aumento de la expresión de la ciclina D1 inducida por la trombina.
- Determinar si la activación de la cinasa mTOR se requiere para la expresión de ciclina D1 y la proliferación inducidas por la trombina.
- Determinar si se requiere la actividad de los complejos 1 y 2 de la cinasa mTOR para la expresión de la ciclina D1 y la proliferación inducidas por la trombina.

## **5. Materiales y método**

### *5.1. Reactivos*

Todos los reactivos utilizados fueron grado cultivo celular. La trombina, la hirudina, el péptido agonista de PAR-1 (H-SFLLRNPNDKYEPF-OH), el Ro-32-0432 y el AG-1478 fueron obtenidos de Calbiochem (San Diego, CA); la wortmannina, la actinomicina D, el AG-1296, la trifluoperazina y el inhibidor de Akt fueron de Sigma (St. Louis, MO); el U0126, el LY294002, el U73-122 y el KN62 fueron obtenidos de Tocris (Ellisville, MO); los péptidos agonistas de PAR-3 (H-SFGGP-NH<sub>2</sub>) y de PAR-4 (H-GYPGKF-NH<sub>2</sub>) fueron obtenidos de Bachem (Torrance, CA); el PPACK y el OSU-03-012 fueron obtenidos de Enzo Life Science (Farmingdale, NY) y de Echelon biosciences (Salt Lake City, UT), respectivamente; el medio de montaje para fluorescencia fue de Dako North America, Inc. (Carpentia, CA) y la albumina de suero bovino (BSA) se obtuvo de Equitech-Bio Inc. (Kerrville, TX). Para todos los experimentos se utilizó como medio estándar Opti-MEM de Invitrogen (Carlsbad, CA). Los antibióticos penicilina, estreptomina, neomicina y nistatina utilizados durante el cultivo celular fueron de Gibco BRL (Grand Island, NY).

Los anticuerpos monoclonales primarios para detectar a Akt, a Akt fosforilado (Ser 473), a la GSK-3 $\beta$  y a la GSK-3 $\beta$  fosforilada (Ser 9) fueron obtenidos de Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). Los anticuerpos monoclonales primarios para detectar a Akt fosforilado (Thr 308), a la ciclina D1, a la actina y a la GAPDH fueron obtenidos de Santacruz Biotechnology (Santacruz, CA, USA). El anticuerpo para detectar a c-fos se obtuvo de Upstate (Millipore; Billerica, MA). Los anticuerpos secundarios acoplados a HRP anti-IgG de conejo y anti-IgG de ratón fueron de Zymed Laboratories (San Francisco, CA, USA).

### *5.2. Cultivo de EPR*

Las células de EPR se aislaron a partir de ratas Long Evans de 8 a 10 días de edad como se ha descrito previamente (Chang et al., 1991). Brevemente, los ojos fueron enucleados y lavados con D-MEM que contenía penicilina (0.0125%), estreptomina (0.0125%), neomicina (0,025%) y nistatina (0,01%), posteriormente se incubaron durante 30 minutos a 37 ° C en D-MEM que contenía 2% de disasa. Después de la eliminación de la esclerótica, el EPR se separó en solución salina balanceada Hanks libre de calcio y de magnesio (HBSS), se incubó en D-MEM con 0.1% de tripsina-EDTA durante 2 minutos y fue disociado mecánicamente utilizando una pipeta Pasteur. La digestión con tripsina fue detenida con medio Opti-MEM con 4% de suero fetal bovino (FBS). Las



células fueron separadas por centrifugación, se suspendieron en medio Opti-MEM con 4% de FBS, y sembradas a una densidad de  $3 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>. Después de 4 días en cultivo, las células fueron privadas de suero durante 48 h antes de la estimulación con trombina (0-4 U / ml), esto con el fin de sincronizar los cultivos. Todos los experimentos se realizaron en cultivos sincronizados.

### *5.3. Ensayo de viabilidad celular*

La viabilidad de las células del EPR se evaluó mediante ensayos de exclusión de azul tripano en cultivos mantenidos en presencia de suero o en medio libre de suero durante 24 y 48 h. Después de la disociación y la separación de las células como se describió anteriormente, se añadió azul tripano (0.08%) a las células en medio D-MEM libre de suero. Las células teñidas con azul tripano y vivas se contaron en una cámara de Neubauer por microscopía óptica y la viabilidad se expresó como porcentaje de células vivas con respecto al número total de células. La comparación de la viabilidad celular en cultivos que contenían suero y los que están privados de suero durante 24 o 48 horas mostró que la privación de suero no afecta a la viabilidad celular en comparación con cultivos en presencia de suero (control). Los cultivos control tienen 78% de células viables, mientras que los cultivos privados de suero por 24 y 48 horas tienen 80% y 73% de células viables, respectivamente.

### *5.4. Medición de la proliferación de las células del EPR*

La proliferación celular del EPR se determinó por medio de la incorporación de [<sup>3</sup>H] timidina y por el método colorimétrico de reducción de MTS [(3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) -5 - (3 - carboxymethoxyphenyl) -2 - (4-sulfofenil)-2H-tetrazolio] en cultivos no confluentes. Para determinar la incorporación de [<sup>3</sup>H] timidina las células fueron incubadas durante 24 horas con 0.2 mCi/ml de [<sup>3</sup>H] timidina (PerkinElmer; Waltham, MA; 16 Ci/mmol) en ausencia (control) o presencia de trombina. Después de tres lavados con PBS, se incubaron los cultivos en ácido tricloroacético (10%) durante 1 hora, posteriormente, se solubilizaron en SDS (0.5 %) y se determinó la radioactividad para cada cultivo en un contador de centelleo líquido (Beckman; Brea, CA). Para evaluar la proliferación de las células del EPR por el método de reducción de MTS (Cell Titer 96<sup>®</sup> Aqueous One Solution Reagent, Promega; Madison, WI) se sembraron las células a una densidad de  $2.5 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup> y según las instrucciones del fabricante las células fueron incubadas con el MTS durante 30 minutos a 37 °C. Se midió la absorbancia a 490/630 nm y se

corrigió el fondo; la densidad óptica (DO) de cultivos no estimulados se estableció arbitrariamente como el 100% de proliferación (control). Cuando fueron probados, los inhibidores se añadieron 1 hora antes de la estimulación con trombina.

#### *5.5. Análisis de la progresión del ciclo celular en el EPR*

El efecto de la trombina sobre la progresión del ciclo celular se determinó mediante un análisis de citometría de flujo. Los cultivos se incubaron con trombina (4 U/ml) durante 18 o 22 h. Las células fueron dissociadas en tripsina/EDTA, se precipitaron por centrifugación, y se resuspendieron en DMEM libre de suero. Posteriormente, las células fueron fijadas en etanol al 70% en PBS, se centrifugaron y se resuspendieron en PBS frío. Finalmente las células se incubaron con solución para teñir el ADN (100 mM Tris, pH 7,4, NaCl 150 mM, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub> 0,5 mM, 0,1% de NP-40, yoduro de propidio 3mM (PI), y 100mg/ml DNasa libre de RNasa) durante 1 hora a 37 °C. Mediante el análisis de la tinción del material genético de las células con PI se generaron histogramas del ciclo celular (FACScalibur 1600). Para cada muestra se registraron veinte mil eventos. Las muestras se analizaron con el programa FlowJo 7.5, motor 2.15000.

#### *5.6. Cuantificación del ARN mensajero de ciclina D1 y c-fos*

La cuantificación del ARN mensajero de ciclina D1 y de c-fos se llevó a cabo mediante la técnica de RT-PCR en tiempo real. El ARN total se aisló utilizando reactivo Trizol (Invitrogen; Carlsbad, CA) y se trató con ADNasa I (Invitrogen), según el protocolo del fabricante. Para la inactivación de la ADNasa se añadió EDTA (2.5 mM) a las muestras de ARN total. La retrotranscripción (RT) del ARN mensajero se realizó utilizando 0.25 µg de ARN total, 100 U de retrotranscriptasa (MMLV-RT, Invitrogen), 10 U de inhibidor de RNasa (RNaseout, Invitrogen), 0.25 µg de oligonucleótido dT (Invitrogen), en el buffer recomendado por el fabricante (50 mM de Tris-HCl a pH 8.3, 75 mM de KCl, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de ditioneitol, DTT). El protocolo para la RT fue: 10 minutos a 80 °C, 60 minutos a 42 °C, y 15 minutos a 75 °C; seguido de incubación con RNasa H (0.2 U, Invitrogen) por 30 min a 37 °C. El ADN copia (ADNc) sintetizado durante la RT se utilizó como sustrato para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real con los oligonucleótidos específicos para ciclina D1 (5'-TGGAGCCCCTGAAGAAGAG-3' y 5'-AAGTGC GTTGTGCGGTAGC-3') y para c-fos (5'-AGATACGCTCCAAGCGGAGA-3' y 5'-CAGTCAAGTCCAGGGAGGTC-3'). La PCR se realizó con 2.5 U de polimerasa (Taq recombinante, Invitrogen), 0.4 mM de cada oligonucleótido, 0.4 mM de

dNTPs, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub> y 0.2 μM de SYTO 9 (Invitrogen) en el buffer recomendado por el fabricante (20 mM de Tris-HCl a pH 8.4, 50 mM de KCl). Para la PCR las muestras se sometieron a 94 °C por 5 minutos y, posteriormente, a 35 ciclos con el protocolo siguiente: 94 °C durante 30 segundos, 60 °C durante 30 segundos, y 72 °C durante 45 segundos. El análisis cuantitativo de la amplificación de ADNc se realizó utilizando el sistema rotor gen 6000 (Corbett Life Science, San Francisco, CA) y los valores se normalizaron con el control. La amplificación de actina se utilizó como control de carga. Cuando fueron probados, inhibidores farmacológicos se añadieron 1 hora antes de la estimulación con trombina.

### *5.7. Expresión de los receptores activados por proteasas*

Para determinar la expresión de los receptores activados por proteasas (PARs) en el EPR se aisló ARN total y se realizó la RT del ARN mensajero como se describió anteriormente. Para la amplificación del ADNc se utilizaron oligonucleótidos específicos para PAR-1 (5'-ATGGGGCCCCGGCGCTTGCTG-3' y 5'-AGCTAGTAGCTTTTTGTATAT-3'), para PAR-3 (5'-ATGGAGATGAAAGTCCTTATC-3' y 5'-CGAGGTCAGCTGATCTACAAT-3'), y para PAR-4 (5'-ATGCTCGGGTTCAGCATCAGC-3' y 5'-CAGAAGTGTAGAGGAGCAAAT-3'). La PCR se realizó con 2.5 U de polimerasa (Taq recombinante, Invitrogen), 0.4 mM de cada oligonucleótido, 0.4 mM de dNTPs y 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub> en el buffer recomendado por el fabricante (20 mM de Tris-HCl a pH 8.4, 50 mM de KCl). Para la PCR las muestras se sometieron a 94 °C por 5 minutos y, posteriormente, a 35 ciclos con el protocolo siguiente: 94 °C durante 30 segundos, 60 °C durante 30 segundos, y 72 °C durante 45 segundos. La amplificación del ADNc de los PARs se llevó a cabo utilizando el sistema Mastercycler personal (Eppendorf; Westbury, NY).

### *5.8. Inmunodetección de proteínas*

Para la inmunodetección de todas las proteínas las células tratadas se rompieron en buffer de lisis que contenía 50 mM de Tris-HCl a pH 7.4, 150 mM de NaCl, 10 mM EDTA, 0.1 % de SDS, 1 % de Triton X-100, 1 % de CHAPS, 0.5 % de NP40, 0.1 % de BSA, 40 mM de β-glicerofosfato, 10 mM de pirofosfato de sodio, y 10 % de un cóctel de inhibidores de proteasas (SIGMA). La proteína contenida en los lisados se cuantificó usando el método de Bradford y 20 μg de proteína total se utilizaron para el análisis de inmunodetección de proteínas. Los lisados fueron solubilizados en buffer Laemmli (0.75 mM de Tris-HCl a pH 8.8, 5 % de SDS, 20 % de glicerol y 0.01 % de azul de

bromofenol), hervidos durante 5 minutos, separados por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS/PAGE, 12.5 %), y se transfirieron a membranas difluoruro polivinildieno (PVDF, Amersham Biosciences). Para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos, las membranas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con una solución de leche al 5% en TBS-T (20 mM de Tris-HCl a pH 7.5, 500 mM de NaCl y 0.1 % de Tween<sup>20</sup>). Posteriormente, las membranas se incubaron toda la noche a 4 °C en una solución de BSA 5 % en TBS-T que contenía alguno de los siguientes anticuerpos primarios: anti-ciclina D1 (1:3000), anti-actina (1:10000), anti-c-fos (1:2000), anti-Akt (1:1000), anti-fosfo-Akt (Ser 473; 1:1000), anti-fosfo-Akt (Thr 308; 1:500), anti-GAPDH (1:10000), anti-GSK-3 $\beta$  (1:1000), anti-fosfo-GSK-3 (Ser 9; 1:2000). Al terminar el periodo de incubación con los anticuerpos primarios, las membranas se lavaron 5 veces con TBS-T y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado a la peroxidasa de rábano en una solución de BSA 5 % en TBS-T. Posteriormente, las membranas se lavaron 5 veces con TBS-T y se procesó su revelado con el sustrato quimioluminiscente Immobilon Western AP (Millipore). La señal se visualizó mediante placas de rayos X Kodak<sup>®</sup> y se digitalizaron las imágenes mediante el sistema Alfa Digi-Doc (Alpho-Innotech; San Leandro, CA). El análisis densitométrico de las bandas se realizó utilizando el programa Quantity One v4.6 de BioRad (Hercules, CA) y los datos se normalizaron utilizando los valores de células no estimuladas (control).

### *5.9. Inmunocitoquímica*

La identidad de las células del EPR y la localización nuclear de la ciclina D1 se examinaron por inmunofluorescencia. Se sembraron las células a una densidad de  $3 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> sobre portaobjetos de vidrio, se sincronizaron y se trataron como fue descrito para la inmunodetección. Después del tratamiento correspondiente, las células se fijaron con 4 % de para-formaldehído durante 20 minutos. Posteriormente, las células se lavaron 3 veces con PBS y se permeabilizaron con una solución Triton X-100 al 0.3% en PBS por 20 minutos y se lavaron 3 veces con PBS. La unión inespecífica de los anticuerpos se evitó incubando las células permeabilizadas con suero al 10 % en PBS durante 45 minutos a temperatura ambiente. Después del bloqueo se añadió el anticuerpo monoclonal primario contra RPE65 (1:200) o contra la ciclina D1 (1:100) en una solución de BSA al 0.1 % en PBS y se mantuvo a 4 °C durante toda la noche. Al terminar la incubación de los anticuerpos primarios, las células se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con

el anticuerpo secundario conjugado con Alexa (1:200) durante 2 horas a temperatura ambiente y en oscuridad. Previo al montaje de la preparación con el medio Dako las células se lavaron 3 veces con PBS y se tiñeron los núcleos con una solución de Hoechst al 10 % en PBS y se lavaron nuevamente 3 veces con PBS. Después del montaje las preparaciones se observaron y fueron fotografiadas en un microscopio confocal Olympus Fluoview FV1000 (Olympus corporation; Tokyo, Japan). El tiempo de exposición y la intensidad del laser se ajustaron para obtener una visualización óptima de las preparaciones y dichos parámetros se mantuvieron para todas las condiciones experimentales.

#### *5.10. Silenciamiento de la ciclina D1*

El ARN pequeño de interferencia (siRNA) fue obtenido de Sigma (SASI\_Rn02\_00269089). El efecto del silenciamiento de la ciclina D1 sobre la proliferación celular del EPR fue probado en cultivos con una confluencia del 30 % al 50 %. La transfección del siRNA se realizó utilizando la lipofectamina RNAi-MAX (Invitrogen) en medio Opti-MEM libre de antibióticos complementado con 4% FBS durante 48 h. Después de la transfección, la proliferación celular se evaluó mediante el método de la reducción de MTS. El silenciamiento de la ciclina D1 se determinó por inmunodetección. Células tratadas con lipofectamina y no tratadas fueron utilizadas como controles.

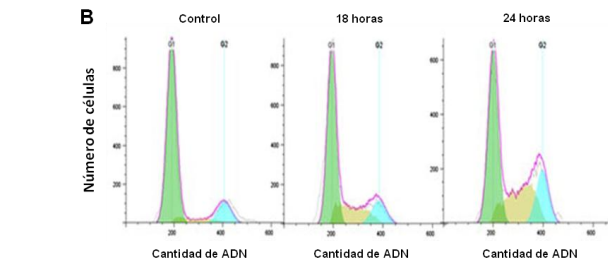
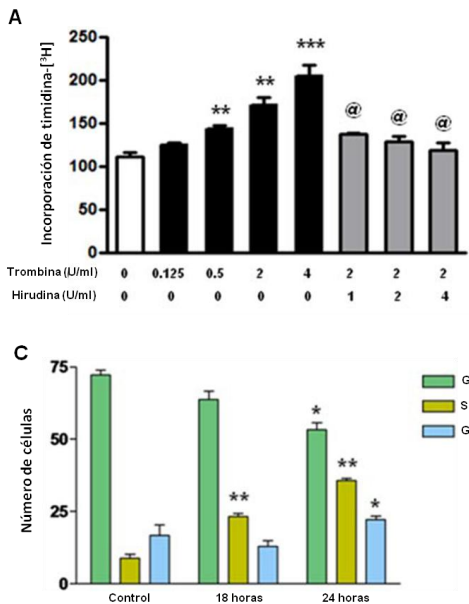
#### *5.11. Análisis estadístico*

Los datos utilizados para el análisis se obtuvieron a partir de cultivos de células de EPR obtenidas de 10 a 15 ratas Long Evans en tres experimentos independientes. Se aplicó una prueba de *t* de Student no pareada para el análisis estadístico de los datos, utilizando el programa GraphPad Prism V4.0 (GraphPad Software Inc.; La Jolla, CA).

## 6. Resultados

### 6.1. Efecto de la trombina sobre la proliferación de las células del EPR

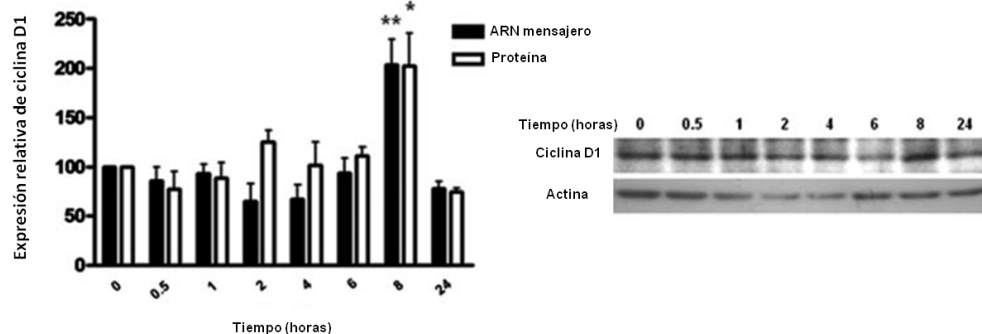
Para analizar el efecto de la trombina sobre las células del EPR se cultivó a las células sin suero y en presencia de trombina (0.125, 0.5, 2 y 4 U/ml) se midió la incorporación de timidina- $^3\text{H}$  como indicador de síntesis de DNA. El efecto de la estimulación con trombina en la proliferación se comparó con células en ausencia de trombina (control). Los resultados de estos experimentos demuestran que la trombina induce un aumento dependiente de la dosis en la proliferación celular en el EPR. Para determinar si el aumento en la proliferación de las células del EPR es inducido de manera específica por la trombina se cultivó a las células con trombina en presencia de su inhibidor específico, la hirudina (1, 2 y 4 u/ml). Los resultados demuestran que el aumento en la proliferación de las células del EPR inducido por la trombina se inhibe en presencia de hirudina de manera dependiente de la dosis (Fig. 3A). El efecto de la hirudina sobre la proliferación se analizó también en células sin estimular (control) y estimuladas con suero fetal bovino (FBS 10 %) y se observó que la hirudina no afecta de manera significativa la proliferación en células del EPR no estimuladas y estimuladas con FBS. El análisis de la progresión del ciclo celular confirmó que la trombina induce la proliferación de las células del EPR. La incubación con trombina por 18 y 22 horas promovió un incremento en el porcentaje de la población celular en fase S del ciclo celular (Fig. 3B y 1C). Esto demuestra que la trombina induce de manera específica un aumento en la proliferación celular del EPR de rata en cultivo.



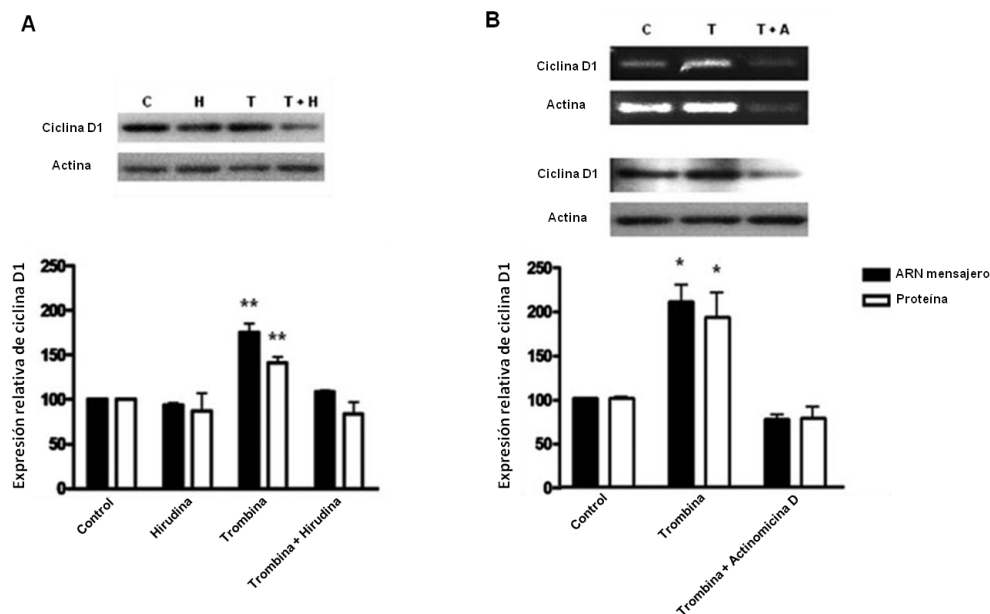
**Fig. 3. La trombina induce la proliferación y la progresión del ciclo celular.** **A.** La incorporación de timidina- $^3\text{H}$  se midió 24 horas después de tratar las células. **B.** Se analizó la progresión del ciclo celular mediante citometría de flujo y se muestra un histograma representativo de células del EPR no estimuladas o tratadas con trombina (4 U/ml). **C.** Porcentaje de células en las fases G1, S y G2. Se determinó la fase celular en la que se encontraban las células con base en la cantidad de ADN por célula. Los resultados corresponden a la media de tres experimentos independientes  $\pm$  DE. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , *t* de Student, respecto al control. @  $P < 0.05$ , *t* de Student, respecto a las células estimuladas con trombina.

## 6.2. La trombina induce la expresión y la localización nuclear de la ciclina D1

La ciclina D1 tiene un papel central en el control de la progresión del ciclo celular y la proliferación. Se ha demostrado que la estimulación mitogénica induce la síntesis y estabilización de la ciclina D1 (Aktas et al., 1997). Para estudiar si la trombina induce aumento en la proliferación de las células del EPR como consecuencia del aumento en la expresión de la ciclina D1 se analizó la expresión del ARN mensajero de ciclina D1 en células estimuladas con trombina (2 U/ml), mediante la técnica de RT-PCR en tiempo real. Los resultados muestran un aumento en la expresión del ARN mensajero de la ciclina D1 a las ocho horas de estimulación con trombina (Fig. 4); la especificidad de este efecto se determinó estimulando a las células con trombina por ocho horas en presencia o ausencia de hirudina (4 U/ml). Los resultados muestran que la hirudina inhibe el aumento en la expresión del ARN mensajero de ciclina D1 inducido por la trombina (Fig. 5A). Para determinar si el aumento en la expresión del ARN mensajero de ciclina D1 en células del EPR produce un aumento en la expresión de la proteína ciclina D1, se analizó el nivel de dicha proteína en células estimuladas con trombina (2 U/ml) mediante la técnica de inmunodetección. Los resultados demuestran que la trombina induce aumento en la expresión de la proteína ciclina D1 a las ocho horas posteriores a la estimulación con trombina (Fig. 4). La coincubación de la trombina con hirudina (4 U/ml) evita el aumento en la expresión de la proteína ciclina D1 inducido por la trombina en células del EPR (Fig. 5A). Para determinar si se requiere de la síntesis de ARN mensajero para el aumento en la expresión de la proteína ciclina D1 se analizó la expresión del ARN mensajero y de la proteína ciclina D1 en células estimuladas con trombina en presencia o ausencia del inhibidor de la transcripción actinomicina D. Los resultados demuestran que el aumento en la expresión de la proteína ciclina D1 requiere de la síntesis del ARN mensajero (Fig. 5B).

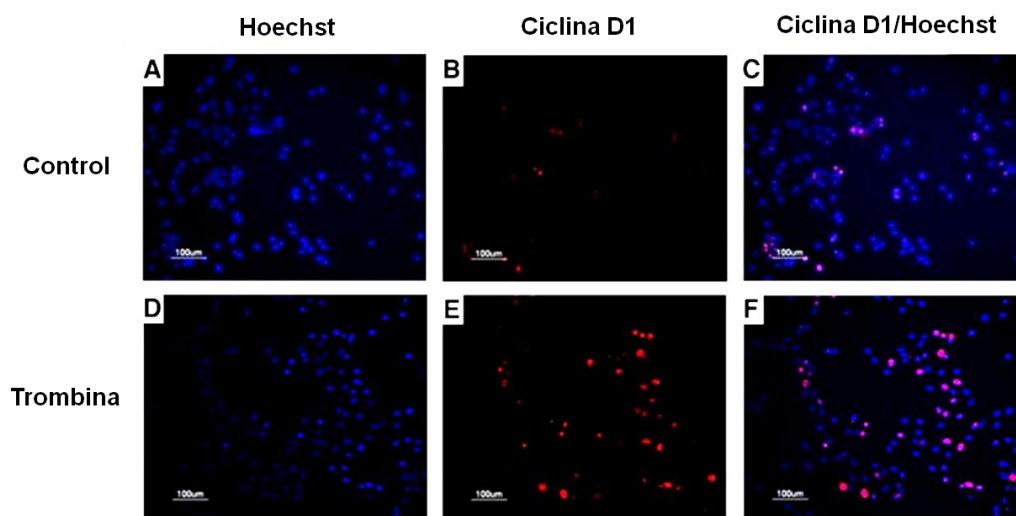


**Fig. 4. La trombina induce la expresión de la ciclina D1.** La expresión del ARN mensajero y de la proteína se midieron por RT-PCR en tiempo real e inmunodetección, respectivamente. La trombina induce aumento en el ARN mensajero y la proteína de la ciclina D1 después de ocho horas de estimulación con trombina. Los resultados corresponden a la media de tres experimentos independientes  $\pm$  DE. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , *t* de Student, respecto al control.



**Fig. 5. La expresión de la ciclina D1 inducida por la trombina requiere de la actividad transcripcional.** **A.** El aumento en la expresión del ARN mensajero y de la proteína de la ciclina D1 se evita con la coincubación del inhibidor natural específico de la trombina, la hirudina. **B.** La preincubación con actinomicina D (20  $\mu$ M) evita el aumento en la expresión de ciclina D1. Los resultados corresponden a la media de tres experimentos independientes  $\pm$  DE. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , *t* de Student, respecto al control.

Se sabe que la progresión del ciclo celular requiere de la localización nuclear de la ciclina D1 (Baldin et al., 1993). Con la finalidad de estudiar si la trombina induce la expresión así como la localización nuclear de la ciclina D1 se analizó la localización celular de la ciclina D1 por medio de la técnica de inmunocitoquímica. Los resultados demuestran que la trombina induce la localización nuclear de la proteína ciclina D1 (Fig 6).

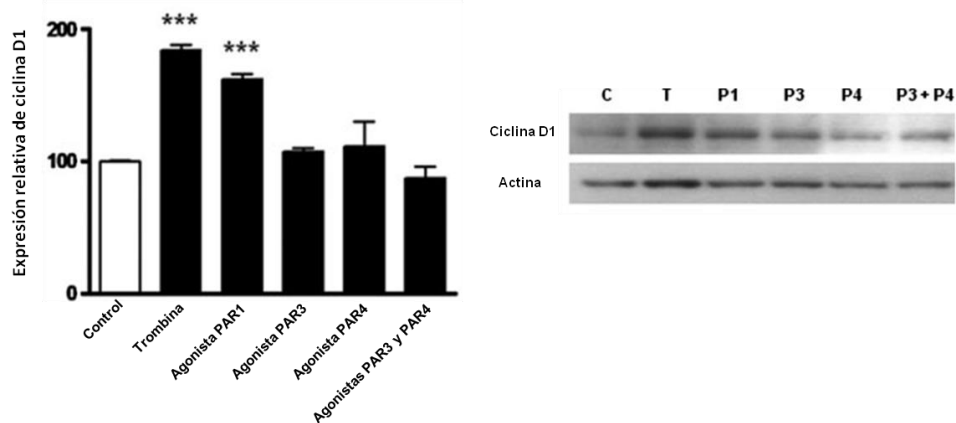


**Fig. 6. La trombina induce la localización nuclear de la ciclina D1.** Después de ocho horas de estimulación con trombina (2 U/ml) se observó un aumento en la localización nuclear de la ciclina D1 por medio de inmunocitoquímica **A** y **D**. Tinción nuclear con Hoechst. **B** y **E**. Inmunoreactividad para ciclina D1. **C** y **F**. Empalme de la tinción de núcleos y la inmunoreactividad para ciclina D1.



### 6.3. La trombina induce la expresión de ciclina D1 a través de la activación de PAR1

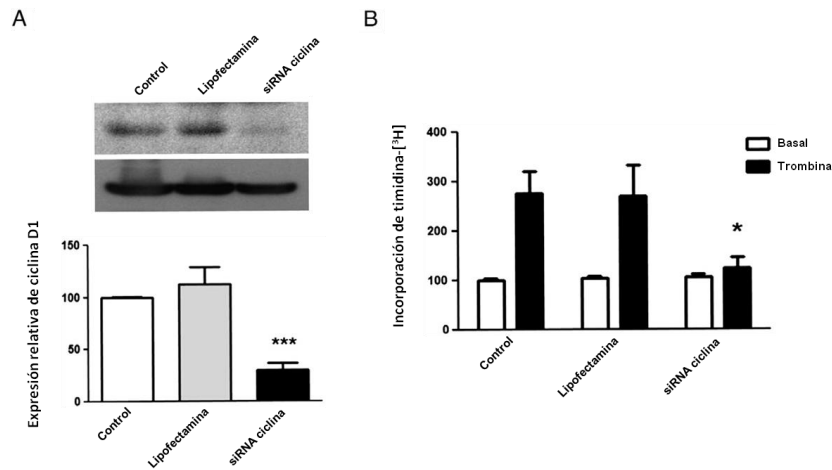
La trombina puede actuar como mitógeno a través de la activación de los PARs. Se conocen 3 miembros de esta familia de receptores activados por la trombina (PAR1, PAR3 y PAR4). Para determinar si la síntesis de ciclina D1 inducida por la trombina requiere la activación de uno o más PARs se analizó la expresión de ciclina D1 inducida por los agonistas de PAR1, PAR3 y PAR4. Los resultados demuestran que la estimulación con el agonista de PAR1 induce la expresión de ciclina D1 a las ocho horas (Fig. 7). Lo anterior sugiere que la trombina induce aumento en la proliferación de las células del EPR como consecuencia de un aumento en la expresión y localización nuclear de la ciclina D1 dependiente de la activación de PAR1.



**Fig. 7. La activación de PAR1 inducida por la trombina promueve la expresión de la ciclina D1.** Después de ocho horas de estimulación con trombina (2 U/ml) o con los péptidos agonistas de PAR1 (P1; 25  $\mu$ M), de PAR3 (P3; 25  $\mu$ M), de PAR4 (P4; 25  $\mu$ M) o de PAR3 y PAR4 juntos (P3 + P4) se analizó la expresión de la proteína ciclina D1. El péptido agonista de PAR1 reproduce el efecto de la trombina sobre la expresión de la proteína ciclina D1. Los resultados corresponden a la media de tres experimentos independientes  $\pm$  DE. \*\*\*  $P < 0.001$ , *t* de Student, respecto al control.

### 6.4. La proliferación inducida por la trombina requiere de la expresión de ciclina D1

Se sabe que la expresión de la ciclina D1 es crucial para la progresión del ciclo celular y, en consecuencia para la proliferación en distintos tipos celulares, incluido el EPR (Hecquet et al., 2002). Debido a que la trombina induce la expresión de la ciclina D1 y la proliferación en células del EPR determinamos si la expresión de ciclina D1 se requiere para la proliferación inducida por la trombina, mediante el silenciamiento de la expresión de la ciclina D1. Los resultados demuestran que se requiere de la expresión de la ciclina D1 para la proliferación inducida por trombina (Fig. 8).

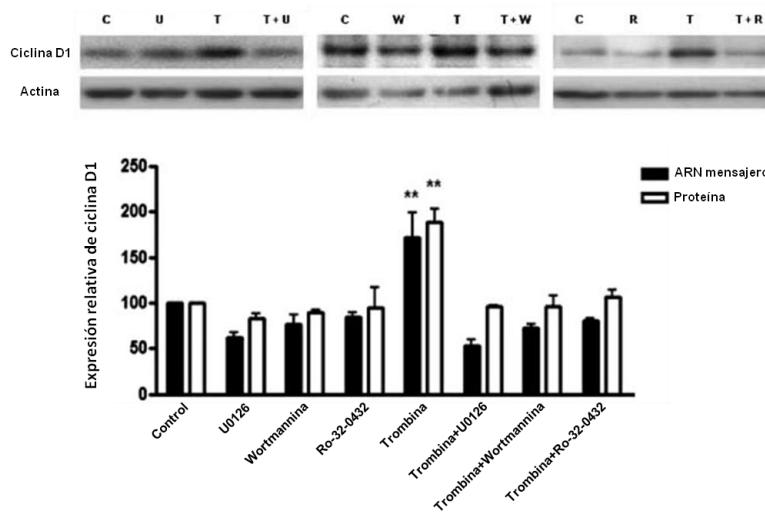


**Fig. 8. La proliferación inducida por trombina requiere la expresión de ciclina D1.** La reducción en la expresión de ciclina D1 se llevó a cabo por medio de la transfección de células de EPR con un ARN de interferencia específico para bloquear la expresión de la ciclina D1 y se midió su efectividad por medio de inmunodetección. El ARN de interferencia redujo en un 75% la expresión de la ciclina D1 (izquierda). La reducción en la expresión de la ciclina D1 evitó la proliferación de las células de EPR inducida por trombina (derecha). Los resultados corresponden a la media de tres experimentos independientes  $\pm$  DE. \*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , *t* de Student, respecto al control.

### 6.5. La expresión de ciclina D1 inducida por la trombina requiere la activación de ERK1-2, de la PI3K y de las cPKC

Se ha demostrado que la trombina induce la expresión de la ciclina D1 en fibroblastos por un mecanismo dependiente de la activación de ERK1-2 (Lavoie et al., 1996). Adicionalmente se sabe que la activación de PAR1 por la trombina induce la proliferación como consecuencia de la activación de ERK1-2 en células de cáncer de colon (Darmoul et al., 2003). Para estudiar la participación de la vía de ERK1-2 en el aumento de la expresión de la proteína ciclina D1 en células de EPR se determinó la expresión de dicha proteína en células estimuladas con trombina (2 U/ml) en presencia o ausencia del inhibidor de MEK1-2 (U0126; 30  $\mu$ M). Los resultados muestran que el U0126 inhibe el aumento en la expresión de la proteína ciclina D1 inducido por la trombina (Fig. 9) Los receptores acoplados a proteínas G pueden inducir la activación de ERK1/2 por un mecanismo que involucra a las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$  y a la PI3K $\gamma$ . Adicionalmente, se ha demostrado que la activación de PAR1 induce la activación de la cascada de señalamiento PI3K/PDK1/Akt (Katso et al., 2001; Resendiz et al., 2007). Para determinar si la activación de la PI3K se requiere para la expresión de ciclina D1 inducida por la trombina (2 U/ml) se observó la expresión de ciclina D1 en células estimadas con trombina en presencia o ausencia del inhibidor de la PI3K (wortmannina; 100 nM). Los resultados muestran que la wortmannina previene el aumento de expresión de la ciclina D1 inducido por la trombina.

Resultados previos han demostrado que la trombina induce la activación de ERK1-2 en células del EPR de rata por un mecanismo que involucra la activación de la PI3K y de la PKC $\zeta$  (Palma-Nicolas et al., 2008b). De acuerdo con lo anterior nuestros resultados sugieren que la activación de la vía PI3K/PKC $\zeta$ /MEK1-2/ERK1-2 se requiere para la expresión de la ciclina D1 en las células del EPR.



**Fig. 9. Efecto de la inhibición de las MAPK MEK1-2 y de la PI3K sobre la expresión de la ciclina D1.** La expresión del ARN mensajero y de la proteína ciclina D1 se midió después de ocho horas de estimulación con trombina. Cuando fueron probados, los inhibidores farmacológicos de la actividad catalítica de MEK1-2 (U0126), de la PI3K (wortmannina) y de la cPKC (Ro-32-0432) se preincubaron 30 minutos antes de la estimulación con trombina. Los resultados corresponden a la media de tres experimentos independientes  $\pm$  DE. \*\*  $P < 0.01$ , *t* de Student, respecto al control.

#### 6.6. Se requiere la activación de las PKCs convencionales para la expresión de la ciclina D1 inducida por la trombina

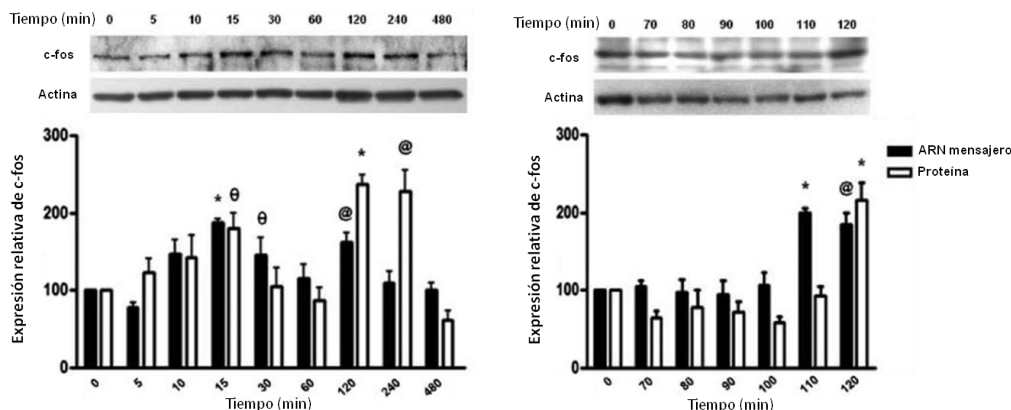
PAR1 está acoplado, entre otras, a proteínas  $G_q$ , las cuales inducen la activación de la PLC $\beta$ , esta activación tiene como resultado el aumento en la concentración intracelular de diacilglicerol (DAG) y  $Ca^{2+}$  (Darmoul et al., 2003). El aumento en la concentración intracelular de DAG y  $Ca^{2+}$  induce la activación de las isoformas convencionales de la PKC (PKC $\alpha$ , PKC $\beta$ , PKC $\beta$ II y PKC $\gamma$ ). Para determinar si la activación de las PKC convencionales se requiere para el aumento de la expresión de la ciclina D1 inducido por la trombina en células de EPR se determinó la expresión de dicha proteína en células estimuladas con trombina (2 U/ml) en presencia o ausencia del inhibidor de las isoformas convencionales de la familia de las PKCs (Ro-32-0432; 20  $\mu$ M). Los resultados muestran que el Ro-32-0432 inhibe el aumento de la expresión de la proteína ciclina D1 inducido por la trombina (Fig. 9).

Debido a que la inhibición farmacológica de las isoformas convencionales de la PKC y de MEK1-2 evita el aumento en la expresión de ciclina D1 inducido por la trombina, estos resultados sugieren

que la trombina promueve la expresión de ciclina D1 por medio de la activación independiente de la vía PLC/PKC convencionales y de la vía PI3K/PKC<sub>γ</sub>/MEK1-2/ERK1-2.

### 6.7. La trombina induce la expresión de c-fos

El promotor de la ciclina D1 tiene, entre otros, un sitio consenso para el factor de transcripción AP1 (Toualbi-Abed et al., 2008). AP1 es un factor de transcripción dimérico formado por miembros de la familia de jun, fos y ATF (Zenz et al., 2008). Estudios previos han demostrado que la trombina induce aumento de la expresión de la proteína c-fos de forma bifásica a los 15 y 120 minutos, manteniéndose el segundo pico hasta los 240 minutos (datos no publicados). Con la finalidad de determinar si el aumento de la expresión de la proteína c-fos coincide con un aumento de la expresión de su ARN mensajero se determinó el nivel de expresión del ARN mensajero de c-fos en células estimuladas con trombina (2 U/ml) por distintos periodos de tiempo por medio de la técnica de RT-PCR en tiempo real. Los resultados demuestran que la trombina induce una expresión bifásica del ARNm de c-Fos que coincide temporalmente con lo observado para la proteína c-Fos (Fig.10).



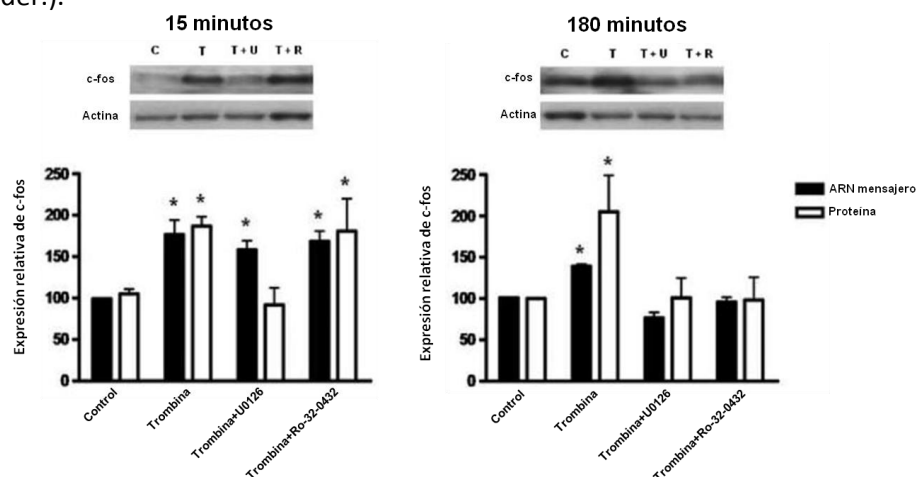
**Fig. 10. La trombina promueve la expresión de c-fos.** La expresión del ARN mensajero y de la proteína c-fos se midió en células estimuladas con trombina. La expresión bifásica del ARN mensajero de c-fos corresponde temporalmente con la expresión de su proteína. Los resultados corresponden a la media de tres experimentos independientes  $\pm$  DE.  $\theta$   $P < 0.05$ , @  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.001$ , *t* de Student, respecto al control.

### 6.8. La expresión tardía de c-fos inducida por la trombina requiere de la actividad de ERK1-2 y cPKC

Se ha demostrado que, tanto ERK1-2, como las cPKC pueden activar la expresión de c-fos (De Sousa et al., 2005; Li and Weinstein, 2006). Debido a que el aumento de la expresión de ciclina D1 inducido por la trombina requiere de la activación de ERK1-2 y de las cPKC se analizó si la

activación de ERK1-2 y las cPKC se requiere para el aumento de la expresión de c-fos inducido por la trombina. Se determinó la expresión de c-fos en células estimuladas con trombina (2 U/ml) por 15 y 180 minutos en presencia o ausencia de U0126 y Ro-32-0432 por medio de RT-PCR e inmunodetección. Los resultados muestran que la inhibición de MEK1-2 o de las cPKC no afecta la expresión del ARN mensajero de c-fos inducida por la trombina a los 15 minutos, sin embargo, la inhibición farmacológica de MEK1-2 si evita el aumento en expresión de la proteína de c-fos inducido por la trombina a los 15 minutos. Estos resultados sugieren que la expresión del ARN mensajero de c-fos inducida por la trombina a los 15 minutos no es promovida por la activación de ERK1-2 ni de las cPKC, sin embargo, se requiere de la activación de ERK1-2 para la estabilización y acumulación de la proteína (Fig. 11, izq.).

La expresión tardía de c-fos inducida por la trombina se inhibe farmacológicamente con U0126 y Ro-32-0432 a nivel de ARN mensajero y de la proteína, lo que sugiere que la expresión de c-fos inducida por la trombina a los 120 minutos es consecuencia de la activación de ERK1-2 y de las cPKC (Fig. 11 der.).

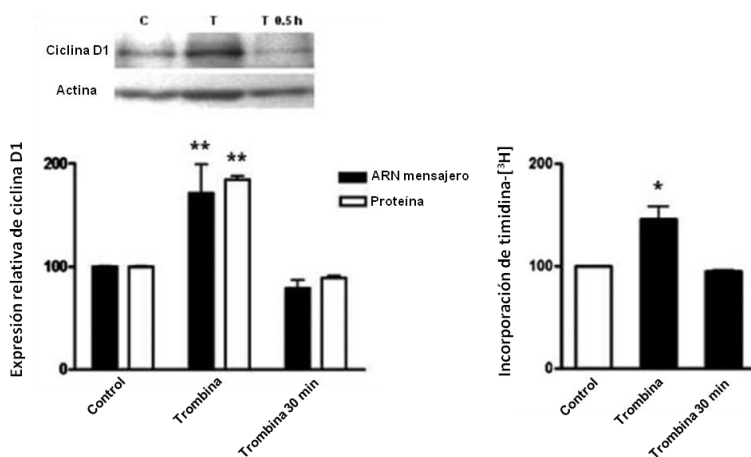


**Fig. 11. Efecto de la inhibición de MEK1-2 y de las PKC convencionales sobre la expresión de c-fos.** La expresión temprana del ARN mensajero de c-fos no se inhibe con U0126 (30 $\mu$ M) o con Ro-32-0432 (20  $\mu$ M), mientras que la inhibición de MEK1-2 evita el aumento en la expresión de la proteína c-fos (izquierda). La expresión tardía del ARN mensajero y de la proteína de c-fos inducida por la trombina se evita con la inhibición de la actividad de MEK1-2 y las cPKC (derecha). Los resultados corresponden a la media de tres experimentos independientes  $\pm$  DE. \* P < 0.05, t de Student, respecto al control.

### 6.9. Se requiere la estimulación sostenida con trombina para inducir la expresión de ciclina D1 y la proliferación celular en el EPR

Debido a que, tanto la expresión de ciclina D1, como la expresión tardía de c-fos (120-240 minutos) inducidas por la trombina requieren de la activación de ERK1-2 y de las cPKC, es probable

que la expresión tardía de c-fos induzca el aumento de la expresión de ciclina D1. Adicionalmente, existe evidencia que ha demostrado que la activación de ERK1-2 inducida por la trombina también es bifásica (10 y 120 minutos) y coincide temporalmente con la expresión de c-fos (Palma-Nicolas et al., 2008b). Con la finalidad de observar si la activación tardía de ERK1-2, el aumento de la expresión de ciclina D1 y el incremento de la proliferación requieren de la estimulación sostenida con trombina se estudió el efecto de la estimulación con trombina (2 U/ml) por 30 minutos sobre la activación de ERK1-2, el nivel de expresión de la ciclina D1 y la proliferación de las células del EPR. Los resultados demuestran que la estimulación con trombina por 30 minutos no induce la activación tardía de ERK1-2, la expresión de la ciclina D1 ni el aumento de la proliferación de las células de EPR (Fig. 12).

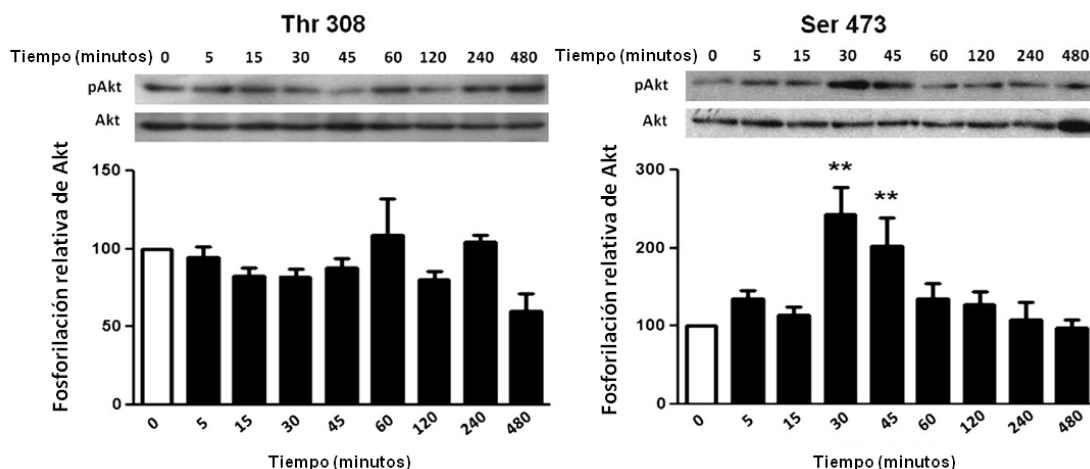


**Fig. 12. La proliferación inducida por la trombina requiere de la estimulación sostenida.** Las células de EPR fueron estimuladas con trombina (2 U/ml) durante 30 minutos, posteriormente se retiró el medio y se colocó medio fresco en presencia o ausencia de trombina. En la imagen se muestra el efecto de la estimulación con trombina durante 30 minutos o durante 8 horas sobre la expresión de ciclina D1 (izquierda) y la proliferación celular (derecha). Los resultados corresponden a la media de tres experimentos independientes  $\pm$  DE. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , *t* de Student, respecto al control.

#### 6.10. La trombina induce la activación de Akt en las células del EPR

La cinasa Akt, también conocida como PKB, es el efector más importante del señalamiento inducido por PI3K. Se ha demostrado que Akt puede promover la estabilización y aumento en la concentración nuclear de la ciclina D1 a través de la fosforilación e inhibición de la Cinasa de la Sintasa del Glucógeno-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ). La activación de la GSK-3 $\beta$  induce fosforilación de la ciclina D1 en la Thr 286 y, de esta manera, promueve su translocación del núcleo al citoplasma por medio de la asociación con el transportador CRM1 (Liang and Slingerland, 2003). Finalmente, la localización citoplásmica de la ciclina D1 induce su ubiquitinación y, en consecuencia, su degradación (Liang and Slingerland, 2003). Debido a que los resultados de este trabajo demuestran que se requiere de

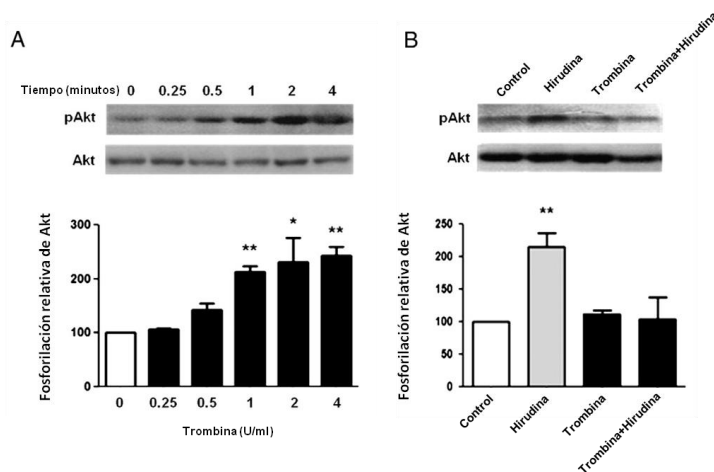
la activación de la PI3K para el aumento en la concentración de la ciclina D1 inducida por la trombina en células de EPR de rata, se determinó el efecto de la trombina sobre la activación de Akt. Para determinar si la trombina induce la activación de Akt se analizó la fosforilación en la Thr 308 y la Ser 473 de dicha cinasa, ya que se ha propuesto que la activación plena de Akt requiere la fosforilación en estos dos residuos. Los resultados demuestran que la trombina induce la fosforilación de la Ser 473 de Akt después de 30 minutos de estimulación, sin embargo, no modifica la fosforilación en Thr 308 (Fig. 13).



**Fig. 13. La trombina promueve la fosforilación de Akt en la SER 473.** Las células de EPR fueron estimuladas con trombina (2 U/ml) por distintos periodos de tiempo. La fosforilación de la Thr 308 y de la Ser 473 fue analizada mediante inmunodetección con anticuerpos específicos. La estimulación con trombina promueve el aumento de la fosforilación en el residuo de Ser 473 a los 30 minutos y hasta los 45 minutos; sin embargo, no modifica la fosforilación en la Thr 308. Los resultados corresponden a la media de tres experimentos independientes  $\pm$  DE. \*\*  $P < 0.01$ , *t* de Student, respecto al control.

La trombina induce la activación de los PARs mediante un corte proteolítico que permite el desenmascaramiento de un nuevo extremo N-terminal que actúa como ligando para el receptor, por lo que la actividad catalítica de esta proteasa se requiere para la activación de los receptores por corte proteolítico. Toda vez que se sabe que la hirudina inhibe los efectos de la trombina mediante una interacción directa con dicha proteasa y tomando en cuenta que se ha sugerido que la trombina puede tener efectos independientes de la activación de los PARs (Schwartz et al., 2005; Seymour et al., 2003; Sower et al., 1999; Vartanian et al., 2006), en este trabajo se estudió el efecto del inhibidor específico de la actividad catalítica de la trombina, PPACK (Kettner and Shaw, 1979) sobre la fosforilación de Akt en la Ser 473. Los resultados demuestran que la preincubación de la trombina (4 U/ml) con sus inhibidores específicos hirudina (8 U/ml) y PPACK (20  $\mu$ M) evita la fosforilación de Akt en la Ser 473 (Fig. 14A). Para corroborar que la fosforilación en la Ser 473 de Akt es un efecto específico de la trombina se analizó dicho fenómeno en

presencia de concentraciones crecientes de trombina, los resultados demuestran que la trombina induce la fosforilación de la Ser 473 de Akt en forma dependiente de la dosis de trombina (Fig. 14B). En conjunto, estos resultados sugieren que la trombina induce de manera específica la activación de Akt.

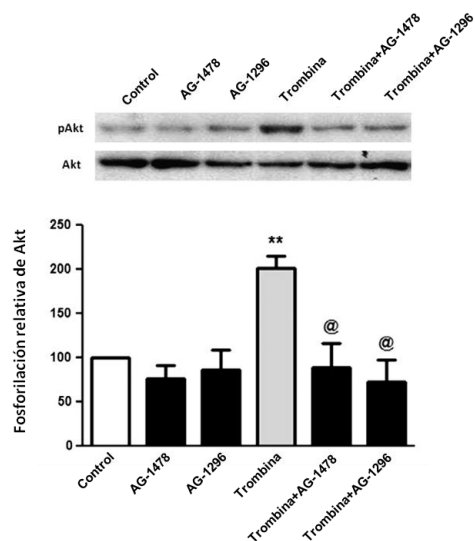


**Fig. 14. La trombina promueve la fosforilación de Akt en la SER 473 de manera específica y dependiente de la dosis. A.** Las células de EPR fueron estimuladas con concentraciones crecientes de trombina y se determinó la fosforilación de la Ser 473 de Akt a los 30 minutos. **B.** La inhibición específica de la trombina con hirudina y con PPACK evita la fosforilación de Akt en la Ser 473. Los resultados corresponden a la media de tres experimentos independientes  $\pm$  DE. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , *t* de Student, respecto al control.

### 6.11. La fosforilación de Akt inducida por la trombina requiere de la actividad de los receptores para EGF y PDGF.

Se ha demostrado que la trombina promueve la transactivación de receptores para factores de crecimiento en células del EPR (Hollborn et al., 2009). Para determinar si la activación de Akt inducida por la trombina requiere de la transactivación de los receptores para EGF y PDGF probamos el efecto de sus inhibidores sobre la activación de Akt. Los resultados demuestran que la activación de Akt inducida por la trombina requiere la transactivación de los receptores para EGF y PDGF (Fig. 15).

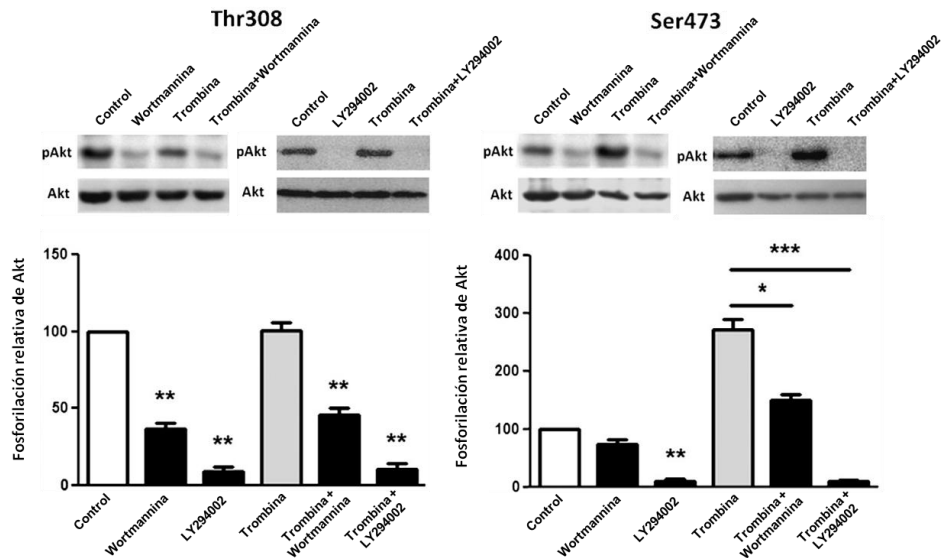




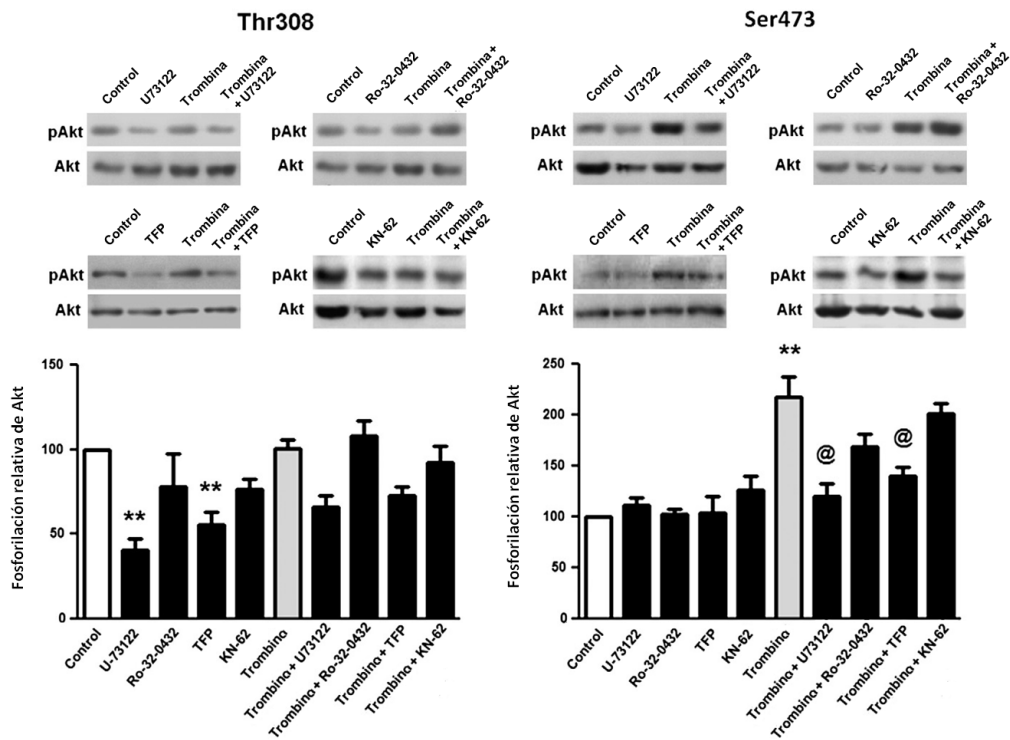
**Fig. 15 La fosforilación de Akt inducida por la trombina requiere la transactivación de los receptores para EGF y PDGF.** Las células de EPR fueron incubadas durante 30 minutos con los inhibidores farmacológicos de los receptores para EGF (AG-1478; 10  $\mu$ M) y PDGF (AG-1296; 10  $\mu$ M), previamente a la estimulación con trombina. La fosforilación de Akt inducida por trombina requiere la actividad de los receptores para EGF y PDGF. Los resultados corresponden a la media de tres experimentos independientes  $\pm$  DE. \*\*  $P < 0.01$ , *t* de Student, respecto al control. @  $P < 0.05$ , *t* de Student, respecto a las células estimuladas con trombina.

#### 6.12. La activación de Akt inducida por la trombina requiere el señalamiento de PI3K, de la PLC y de la calmodulina

La plena activación de Akt requiere de la fosforilación en los residuos de Thr 308 y Ser 473, y se sabe que al menos dos diferentes vías controlan la fosforilación de Akt (Carnero, 2010). El señalamiento de la PI3K es necesario para la fosforilación en la Thr 308 y se sabe que actúa a través de un mecanismo que implica la activación de PDK1, mientras que la fosforilación en la Ser 473 es independiente de PI3K y depende del señalamiento de la PLC, de las PKC y de la CaMKII en células estimuladas con trombina (Resendiz et al., 2007). Para determinar si la fosforilación de Akt inducida por la trombina requiere de la actividad de la PI3K, de la CaMKII, de la PLC, de las cPKC o de la calmodulina, se evaluó el efecto de sus inhibidores farmacológicos (wortmannina, KN-62, U-73122, Ro-32-0432 y trifluoperazina, respectivamente) sobre la fosforilación de Akt en células de EPR estimuladas con trombina. Los resultados demuestran que se requiere de la actividad de la PI3K, de la PLC y de la calmodulina para la fosforilación de Akt inducida por la trombina (Ser 473) y para la fosforilación basal en la Thr 308. Estos resultados también demuestran que la fosforilación de Akt inducida por la trombina es independiente de la CaMKII y de las cPKC (Figs. 16 y 17).



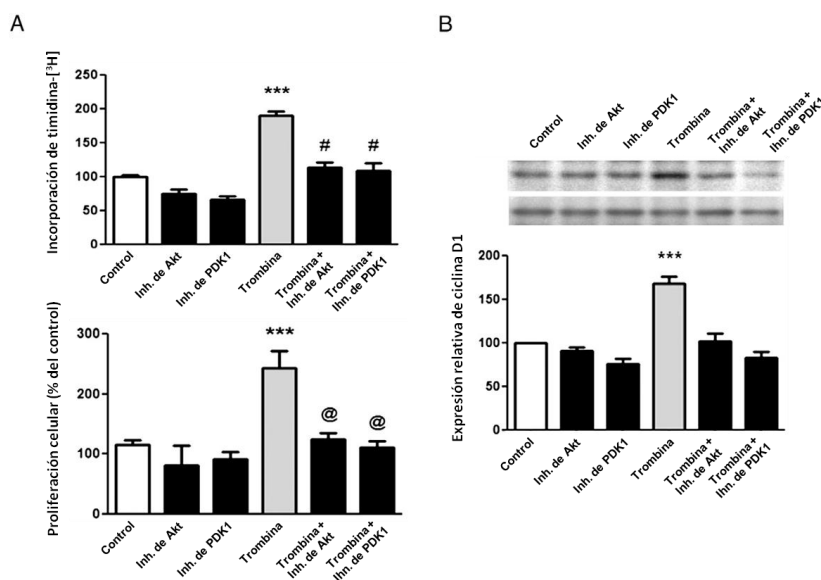
**Fig. 16** La fosforilación de Akt inducida por la trombina depende de la activación de la PI3K. Las células de EPR fueron incubadas durante 30 minutos con los inhibidores farmacológicos de la PI3K (wortmannina, 100 nM; LY294002, 10  $\mu$ M), posteriormente se estimularon con trombina. Los inhibidores de la actividad catalítica de la PI3K evitan la fosforilación de Akt inducida por trombina en la Ser 473 y disminuyen la fosforilación basal en la Thr 308. Los resultados corresponden a la media de tres experimentos independientes  $\pm$  DE. \*\*  $P < 0.01$ , *t* de Student, respecto al control. \*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , respecto a las células estimuladas con trombina.



**Fig. 17** La fosforilación de Akt inducida por la trombina requiere la activación de la PLC y de las cPKC. Previo a la estimulación con trombina las células fueron preincubadas con los inhibidores de la PLC (U73122, 2.5 nM), de las cPKC (Ro-32-0432, 20  $\mu$ M), de la calmodulina (trifluoperazina; TFP, 50  $\mu$ M) y de la CaMKII (KN92, 5  $\mu$ M). Únicamente la inhibición de la PLC y de la calmodulina evitan la fosforilación de la Ser 473 inducida por la trombina y reducen la fosforilación basal de la Thr 308 de Akt. Los resultados corresponden a la media de tres experimentos independientes  $\pm$  DE. \*\*  $P < 0.01$ , *t* de Student, respecto al control. @  $P < 0.01$ , *t* de Student, respecto a las células estimuladas con trombina.

### 6.13. Se requiere la activación de la PDK1 y de Akt para la proliferación y para la expresión de ciclina D1 inducidas por la trombina

Se sabe que la vía de PI3K/PDK1/Akt es clave en la regulación de la proliferación en distintos tipos celulares, así como en el desarrollo de trastornos proliferativos (Kandel and Hay, 1999). Los resultados del presente trabajo demuestran que la activación de la PI3K se requiere para la expresión de la ciclina D1 y por consiguiente para la progresión del ciclo celular, sin embargo, se sabe que la activación de PI3K promueve la activación de ERK1-2 por un mecanismo dependiente de la PKC $\zeta$ , lo cual sugiere que la inhibición de la PI3K podría evitar la proliferación celular del EPR abatiendo la activación de ERK1-2 sin afectar el señalamiento de Akt. Para determinar si la activación de Akt inducida por la trombina es necesaria para la proliferación celular en el EPR, se observó el efecto de los inhibidores de Akt (500 nM) y de PDK1 (5  $\mu$ M) sobre la proliferación y la expresión de ciclina D1. Los resultados demuestran que se requiere de la activación de Akt y PDK1 para la proliferación y para la expresión de la ciclina D1 inducida por la trombina en células del EPR (Fig.18).

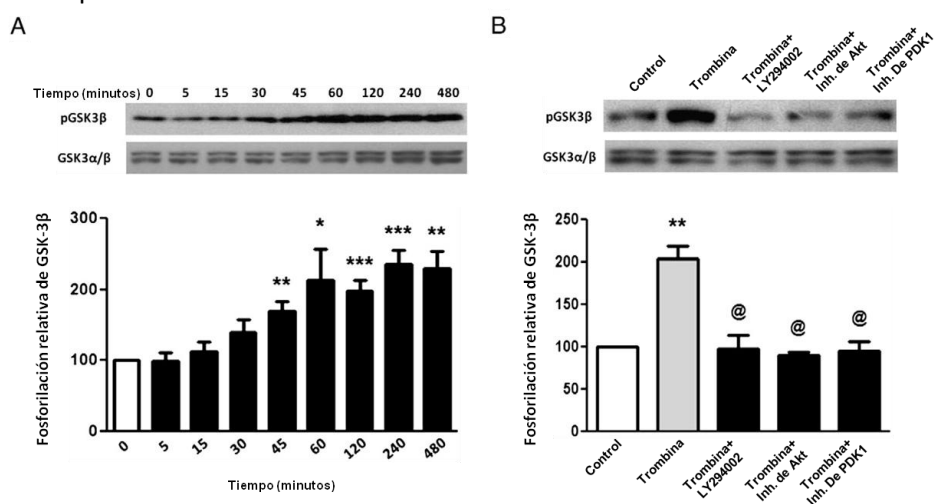


**Fig. 18 La proliferación inducida por la trombina requiere la activación de la PDK1 y de Akt.** A. La inhibición farmacológica de la actividad catalítica de la PDK1 y de Akt evita la síntesis de ADN y la proliferación en las células de EPR. B. La expresión de ciclina D1 inducida por la trombina requiere la activación de la PDK1 y de Akt. Los resultados corresponden a la media de tres experimentos independientes  $\pm$  DE. \*\*\* P < 0.001, *t* de Student, respecto al control.

### 6.14. La trombina induce la fosforilación de GSK-3 $\beta$ por un mecanismo dependiente de Akt

Se ha demostrado que la activación de Akt promueve un aumento de ciclina D1 a través de diferentes mecanismos moleculares (Liang and Slingerland, 2003; Ma and Blenis, 2009; Ouyang et

al., 2006). El señalamiento de Akt no sólo induce la expresión de ciclina D1. Una vez activada, Akt también promueve la acumulación de ciclina D1 por la inhibición de GSK-3 $\beta$  (Cross et al., 1995). Dado que la inhibición de la vía PDK1/Akt impide la expresión de ciclina D1 inducida la trombina en células del EPR se analizó la fosforilación de la GSK-3 $\beta$  en la Ser 9 en las células estimulas con trombina. Los resultados demuestran que la trombina induce la fosforilación de la GSK-3 $\beta$  en la Ser 9 después de 60 minutos de estimulación y dicho residuo se mantiene fosforilado hasta 480 minutos después de la estimulación (Fig. 19A). Más aún, la fosforilación de la GSK-3 $\beta$  inducida por la trombina requiere la activación de la vía PI3K/PDK1/Akt (Fig. 19B). En conjunto, estos resultados sugieren que la trombina promueve la inactivación de la GSK-3 $\beta$  por un mecanismo dependiente de Akt.



**Fig. 19 La trombina promueve la fosforilación/inactivación de la GSK-3 $\beta$ .** La fosforilación de la Ser 9 en la GSK-3 $\beta$  inducida por la trombina se midió a través de inmunodetección. **A.** Las células de EPR fueron estimuladas con trombina durante diferentes periodos de tiempo. La trombina induce la fosforilación de la GSK-3 $\beta$  después de 45 minutos y hasta los 480 minutos. **B.** La inhibición de la actividad de la PI3K, de la PDK1 y de Akt evita la fosforilación inducida por la trombina en células del EPR. Los resultados corresponden a la media de tres experimentos independientes  $\pm$  DE. \* P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001, *t* de Student, respecto al control. @ P < 0.01, *t* de Student, respecto a las células estimuladas con trombina.

## 7. Discusión

Tras la alteración de la barrera hematorretiniana, la interacción de las células EPR con componentes del plasma sanguíneo es un factor de riesgo importante para el desarrollo de trastornos oculares proliferativos generados por la transición epitelio-mesénquima, la proliferación y migración de las células RPE, y la formación de membranas epirretinianas que obstruyen la visión. De hecho, la hemorragia intraocular durante o después de la cirugía es uno de los factores de riesgo más importantes en la clínica para el desarrollo de la vitreorretinopatía proliferativa (Girard et al., 1994), la principal causa de fracaso de la cirugía de retina (Nagasaki et al., 1998; Pastor et al., 2002). La trombina es un componente principal del suero sanguíneo y promueve la expresión de ciclina D1 y la proliferación en diferentes tipos celulares, aunque los mecanismos moleculares involucrados no han sido aclarados en su totalidad. La ciclina D1 es una proteína clave en el control de la progresión del ciclo celular y se ha demostrado que su expresión puede aumentar en diversos tumores y en células transformadas (Aktas et al., 1997; Baldin et al., 1993; Yang et al., 2006). Por lo anterior, en este trabajo se analizó el efecto de la trombina sobre la expresión de la ciclina D1, con el fin de identificar el mecanismo molecular que promueve la proliferación en células de EPR estimuladas con trombina.

Los efectos celulares de la trombina en múltiples procesos fisiológicos y patológicos se logran a través de la activación de los PARs. En este estudio se ha demostrado que la activación específica de PAR-1 con trombina estimula la expresión del gen y de la proteína de la ciclina D1, así como su localización nuclear. Además, la trombina también induce la síntesis de ADN y la progresión del ciclo celular en las células EPR, lo cual concuerda con resultados anteriores obtenidos en fibroblastos que muestran que la trombina aumenta la actividad transcripcional de distintos genes implicados en la proliferación (Keenan et al., 2004). Sin embargo, aún se conoce poco sobre las vías de señalamiento intracelular y reguladores responsables de la inducción de la proliferación de células del EPR. Varios estudios realizados principalmente en fibroblastos han demostrado que la expresión de ciclina D1 y la progresión del ciclo celular inducida por estímulos mitógenos requiere tanto la actividad ERK1/2 como la expresión de las proteínas de la familia del factor de transcripción AP-1 (Gutierrez-Venegas and Castillo-Aleman, 2008).

Los resultados de este trabajo demuestran que la expresión de ciclina D1 inducida por la trombina en células del EPR se impide cuando se bloquea la actividad de las MAPK MEK1-2 con el inhibidor farmacológico U0126, lo que sugiere que la trombina estimula la expresión de ciclina D1 a través

de la vía de señalización Ras/Raf/MEK1-2/ERK1-2. Sin embargo, nuestros resultados indican que la activación de ERK es necesaria pero insuficiente para la inducción de la expresión de la ciclina D1, ya que este efecto fue suprimido por la inhibición de la PI3K, la cual juega un papel central en el control de la proliferación (Katso et al., 2001; Kong and Yamori, 2008). En concordancia con este resultado, se ha demostrado que si bien la activación de MEK1 es suficiente para la síntesis de ADN (Treinies et al., 1999), la inhibición de la PI3K evita este efecto lo que indica que la activación de MEK1 en sí no es capaz de promover la progresión del ciclo celular de la fase G1 a S mediada por la ciclina D1 (Liang and Slingerland, 2003). De acuerdo con estos resultados, nuestros datos sugieren que la acción de la trombina en el PAR-1 puede activar la cascada de señalización MAPK a través de la subunidad Gq $\alpha$  de los GPCR (Pearson et al., 2001).

Aunque la activación de la PI3K inducida por el dímero Gq $\beta\gamma$  (Leopoldt et al., 1998) puede aumentar la concentración celular de la proteína ciclina D1 por estabilización a través de la inhibición de la cinasa de la sintasa del glucógeno-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ; Liang and Slingerland, 2003), se descartó que esto sea lo que ocurre en el resultado de la figura 9, puesto que la estimulación de trombina en presencia de wortmannina impidió completamente el aumento de la expresión del ARN mensajero de la ciclina D1, lo que indica que la activación de PI3K es necesaria para la transcripción de ciclina D1. Adicionalmente, experimentos en presencia de actinomicina D, muestran que la inhibición de la transcripción suprime el aumento en la concentración celular del RNA mensajero y de la proteína ciclina D1 en respuesta a la trombina.

Aunque aún son necesarias futuras investigaciones para determinar con precisión los mecanismos moleculares de acción de la PI3K en expresión de ciclina D1 inducida por la trombina, se sabe que dicha proteasa puede activar la cascada de Ras/MAPK por un mecanismo que depende de la activación de la PI3K en células endoteliales (Ellis et al., 1999). En este sentido, datos recientes han demostrado que la fosforilación de ERK1-2 inducida por la trombina en células del EPR es independiente de Ras y requiere de la activación de la PI3K, de la PKC $\zeta$ , de Raf y de MEK1-2 (Palma-Nicolas et al., 2008a). En conjunto, los datos anteriores sugieren que la trombina induce un aumento de la expresión de la ciclina D1 mediante la activación de PAR1 y de la vía de señalamiento PI3K/PKC $\zeta$ /Raf/MEK1-2/ERK1-2 en las células del EPR de rata.

Además de las vías de señalamiento de la PI3K y ERK1-2, se ha demostrado que las isoformas convencionales de la PKC (cPKC) también pueden inducir aumento en la expresión del ARN mensajero y de la proteína ciclina D1 (Li and Weinstein, 2006). En las células del EPR, la activación

de PAR-1 inducida por la trombina estimula la actividad de la PLC $\beta$  y, en consecuencia, la formación de IP<sub>3</sub> y DAG (Palma-Nicolas et al., 2008a), los cuales inducen la activación de las cPKC. El hallazgo de que la inhibición de las cPKC con Ro-32-0432 evita la expresión de la ciclina D1 inducida por la trombina muestra que la activación de las cPKC también es necesaria para el aumento en la expresión de la ciclina D1 inducido por la trombina en las células del EPR de rata.

El promotor del gen de la ciclina D1 contiene secuencias consenso para los factores de transcripción de la familia AP-1, CREB y NF-kB (Shaulian and Karin, 2001). Entre estos factores, se ha demostrado que la expresión de las proteínas c-fos y c-jun, así como la unión al ADN del factor de transcripción AP-1 requiere la activación de ERK1-2 dependiente del señalamiento de la PI3K (Zenz et al., 2008). Adicionalmente, existe evidencia que demuestra que las isoformas  $\beta$ 1 y  $\beta$ 2 de las cPKC inducen la expresión c-fos, así como la activación transcripcional de los genes regulados por c-fos (Li and Weinstein, 2006). Falta un antecedente de que la expresión de c-fos induce la actividad de AP-1. Por lo anterior, en este trabajo se examinó el efecto de la trombina sobre la expresión de c-fos y se demostró que la trombina induce la expresión bifásica del ARN mensajero y de la proteína de c-fos. Mientras que el aumento temprano (15 minutos) en la expresión de la proteína c-fos depende solo de la actividad de ERK1-2, el aumento tardío en la expresión de la proteína y del ARN mensajero de c-fos (120 minutos) requiere la activación de ambos, ERK1-2 y cPKC. Dado que la expresión de ciclina D1 y de c-fos fueron suprimidas por la inhibición independiente de MEK1-2 o de las cPKC, se sugiere que la activación de ambas vías por la trombina converge en la expresión de c-fos, lo cual promueve la actividad transcripcional de AP-1 y, consecuentemente, la expresión de la ciclina D1. Este señalamiento coordinado de MEK1-2 y de las cPKC que converge en la expresión de c-fos concuerda con lo que se ha descrito recientemente para las células de cáncer de mama (Li and Weinstein, 2006).

Debido a que la trombina induce la expresión bifásica de c-fos, en este trabajo se determinó si se requiere la estimulación sostenida con trombina para promover la proliferación de las células del EPR de rata. Los resultados obtenidos muestran que si las células son estimuladas con trombina solo durante 30 minutos, tiempo suficiente para que ocurra el aumento temprano de c-fos, no se promueve la expresión de ciclina D1 y la proliferación. En este sentido, resultados previos han demostrado que la trombina induce la activación bifásica de ERK1-2 en el EPR, la cual coincide temporalmente con la expresión de c-fos. Más aun, al igual que la expresión de c-fos, la activación tardía de ERK1-2 requiere la estimulación sostenida con trombina. Estos resultados concuerdan

con lo observado en fibroblastos de hámster chino, donde se ha demostrado que la activación sostenida de ERK1-2 inducida con PDGF promueve la expresión, la estabilización y la acumulación sostenida de c-fos, lo que conduce a la progresión del ciclo celular; mientras que la estimulación con EGF solo promueve la actividad de ERK1-2 por un lapso corto de tiempo (10 minutos), lo que tiene como resultado la expresión temprana de c-fos y su rápida degradación, sin promover la proliferación de dichos fibroblastos (Murphy et al., 2002).

Un resultado inesperado de este estudio fue que, aunque el aumento temprano en la expresión del ARN mensajero de c-fos observado a los 15 minutos no se evitó por la inhibición de MEK1-2 o de las cPKC, el aumento de la proteína c-fos fue dependiente de ERK1-2, lo que sugiere que la expresión temprana del ARN mensajero de c-fos y el aumento en la concentración de la proteína c-fos inducidos por la trombina son procesos independientes y podría incluir al menos dos diferentes vías de señalización. Aunque el mecanismo responsable de la expresión temprana del ARN mensajero de c-fos sigue sin determinarse, es posible que la activación de las proteínas  $G_{12/13}$  acopladas a PAR-1 promuevan la expresión del gene c-fos, ya que se ha descrito que la activación de la vía de Rho puede promover la expresión del ARN mensajero de c-fos por medio de la unión del factor de respuesta al suero (SRF) con el elemento de respuesta al suero (SRE) presente en el promotor de c-fos (Villalonga and Ridley, 2006). Por otra parte, se ha demostrado que la fosforilación de la proteína c-fos por ERK1-2 promueve su estabilización y acumulación nuclear (Murphy et al., 2002), lo cual explicaría la inhibición del aumento temprano de la proteína c-fos por U0126, pero no por los inhibidores de cPKC.

Adicionalmente a la activación de ERK1-2 y las cPKC, la estimulación con trombina también puede promover la progresión del ciclo celular a través del señalamiento de Akt, la cual es una cinasa clave en el control de la proliferación y, tanto su expresión como su activación está aumentada en células tumorales (Carnero, 2010). En este estudio también se demuestra que, en contraste con los hallazgos que muestran que la trombina induce la fosforilación de Akt, tanto en Thr 308 y Ser 473 en diferentes tipos celulares (Resendiz et al., 2007), este mecanismo es diferente en las células del EPR. Considerando que el nivel de fosforilación de Akt en Thr 308 permanece inalterado por el tratamiento con trombina, la fosforilación en Ser 473 se incrementó de una manera específica y dependiente de la dosis, lo que indica que la fosforilación de la Ser 473 es el evento regulador en la activación de Akt inducida por la trombina en las células del EPR.



Cabe resaltar que la estimulación de la fosforilación de Akt en la Ser 473 con trombina requiere 30 minutos de exposición a trombina, lo cual difiere de la rápida fosforilación de Akt observada en respuesta a la activación de receptores con actividad de cinasas de tirosina (Byeon et al., 2010; Hollborn et al., 2006), lo que sugiere que un mecanismo indirecto podría mediar el señalamiento de PAR1 sobre Akt. Existe evidencia reciente que muestra que la trombina estimula la secreción de VEGF en las células del EPR a través de la transactivación del receptor de PDGF por PAR1 (Hollborn et al., 2009), se probó el efecto de la inhibición de los receptores para EGF y para PDGF. Los resultados mostraron que la trombina estimula la fosforilación de Akt a través de la transactivación de los receptores para dichos factores de crecimiento, lo que explica el retraso en la fosforilación de Akt inducida por la trombina en comparación con lo observado en células estimuladas con VEGF o PDGF.

Las vías de señalamiento de la PI3K, de la CaMK y de las PKC controlan la actividad de Akt (Resendiz et al., 2007). En este sentido, se ha demostrado que la trombina induce la activación de la PI3K a través de un mecanismo que depende de las subunidades  $G_{i\beta\gamma}$  acopladas a PAR-1 (Chung et al., 2010). Además, la inducción de la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B por la trombina en células endoteliales involucra el señalamiento en paralelo de las vías  $G_{q\alpha}$ /PKC y  $G_{i\beta\gamma}$ /PI3K que convergen en la activación de Akt (Rahman et al., 2002). Por lo anterior aquí se analizó la posible contribución de estas vías a la activación de Akt inducida por la trombina en las células del EPR. Como era de esperar, la inhibición de PI3K por wortmannina o LY294002 reduce la fosforilación basal de Akt en Thr 308. Sorprendentemente, la estimulación de la fosforilación de la Ser 473 de Akt inducida por la trombina también fue impedida por la inhibición de la PI3K, lo que indica que la fosforilación en la Thr 308 se requiere para la fosforilación de la Ser 473, lo cual concuerda con datos recientes obtenidos en células de cáncer (Carnero, 2010). Adicionalmente, la inhibición de la PI3K podría impedir la fosforilación de la Ser 473 de Akt como resultado de la disminución en la formación de  $PIP_3$ , el cual es necesario para el reclutamiento de Akt a la membrana plasmática, previo a su activación (Alessi and Cohen, 1998).

Se ha demostrado que la trombina induce la actividad de la fosfolipasa C (PLC) y, consecuentemente, el aumento en las concentraciones celulares de DAG e  $IP_3$  ( $Ca^{++}$ ) en células del EPR (Palma-Nicolas et al., 2008a). Puesto que el aumento en las concentraciones celulares de DAG y  $Ca^{++}$  estimula la activación de las isoformas nuevas y convencionales de la PKCs, así como las CaMKs, se analizó la contribución de estas vías a la fosforilación de Akt inducida por la trombina.

Los resultados demuestran que mientras que la inhibición de la PLC $\beta$  impide la fosforilación de Akt en la Ser 473 inducida por la trombina, la inhibición de las PKC con el Ro-32-0432, no tuvo ningún efecto. Aunque no se puede descartar la participación de las isoformas nuevas PKC $\delta$  y PKC $\theta$ , las cuales no son inhibidas por el Ro-32-0432 (Yu et al., 2007), estos resultados sugieren que el señalamiento de la PLC hacia Akt depende de proteínas diferentes a las PKC sensibles a DAG (cPKC y PKC $\epsilon$ ).

Entre las CaMK activadas por el aumento de Ca<sup>++</sup> derivado de la actividad de la PLC, el señalamiento de la CaMKII se ha relacionado con la activación de Akt (Yano et al., 1998). Los experimentos realizados en este trabajo han demostrado que, a pesar de que la CaMKII no parece estar involucrada en la fosforilación de Akt inducida por la trombina, la inhibición de la calmodulina impidió la fosforilación inducida por la trombina en la Ser 473 de Akt y disminuyó el nivel basal de fosforilación en la Thr 308, lo que demuestra que la activación dependiente de la PLC de una cinasa activada por calcio/calmodulina, distinta de CaMKII se requiere para el efecto de trombina en la activación de Akt en las células RPE. En este sentido, evidencia reciente ha demostrado que Akt es un blanco para la CaMKIII, también conocida como la cinasa del factor de elongación en eucariontes-2 (eEF-2) (Cheng et al., 2011), y por lo tanto, podría ser la cinasa responsable de la fosforilación de Akt dependiente de la PLC observada en células del EPR estimuladas con trombina.

Debido a que la trombina induce la expresión de ciclina D1 y la proliferación de las células del EPR, en este trabajo se analizó el efecto de la inhibición de la PDK1 o Akt sobre la acumulación de la proteína ciclina D1 y se demostró que la activación de PDK1 y Akt se requiere para la acumulación de ciclina D1. Adicionalmente, el silenciamiento de la expresión de ciclina D1 con secuencias pequeñas de ARN de interferencia (siRNAs) evitó la síntesis de ADN y la proliferación celular. El mismo resultado se observó al inhibir la activación de la PDK1 y de Akt. Todo lo anterior en conjunto demuestra que la trombina estimula la proliferación celular del EPR por medio del aumento en la concentración celular de ciclina D1, el cual requiere la activación de Akt.

Además del control transcripcional, Akt puede contribuir a la acumulación nuclear de la ciclina D1 a través de la fosforilación de la GSK-3 $\beta$  en la Ser 9, lo cual inactiva esta enzima, evitando la degradación de la ciclina D1 (Cross et al., 1995; Liang and Slingerland, 2003). En este trabajo se demuestra que la estimulación con trombina promueve la fosforilación sostenida de la GSK-3 $\beta$  hasta los 480 minutos y que dicha fosforilación requiere de la actividad de PDK1 y Akt. Tomando

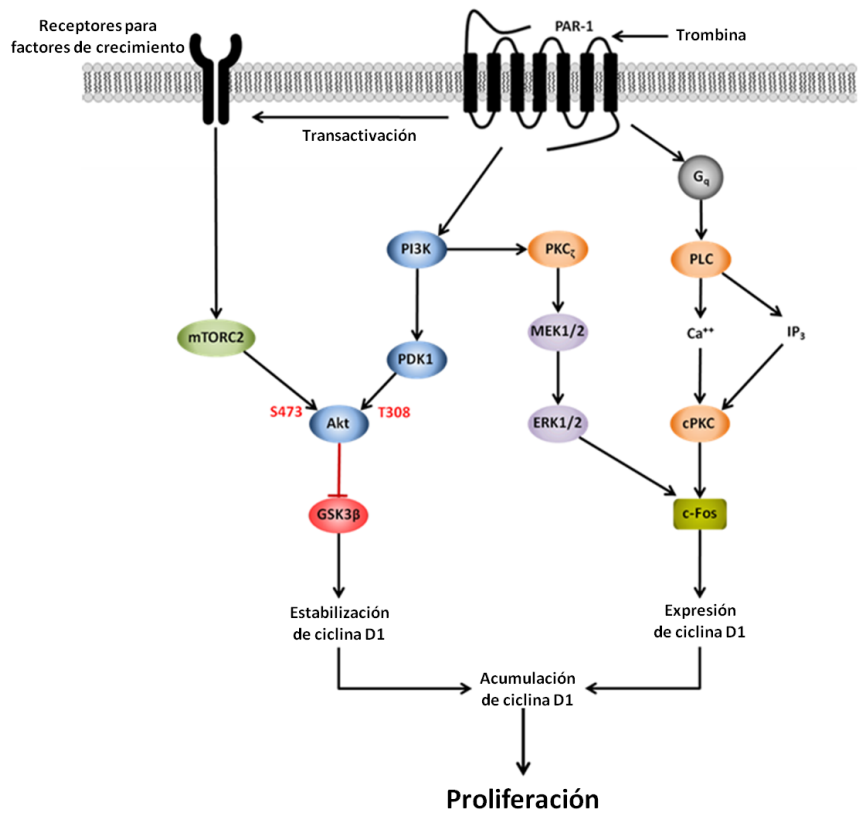
en cuenta que la trombina induce la acumulación nuclear de la proteína ciclina D1 después de 480 minutos de estimulación, estos resultados sugieren que la activación de Akt aumenta la concentración nuclear de la ciclina D1 mediante estabilización de la proteína traducida.

Aunque el mecanismo por el cual la activación transitoria de Akt (30 a 45 minutos) induce la fosforilación sostenida de GSK-3 $\beta$  en la Ser 9 requiere mayor investigación, nuestros resultados sugieren que mientras que Akt es responsable de la fosforilación de la GSK-3 $\beta$ , el estado fosforilado se mantiene a través de un mecanismo molecular distinto. Recientemente, se ha demostrado que la isoforma atípica PKC $\zeta$  fosforila directamente a la GSK-3 $\beta$  en Ser 9 (Oriente et al., 2001). Más aún, tomando en cuenta que la proliferación de las células del EPR y la activación de ERK1-2 inducidas por la trombina en células del EPR requiere de la actividad de la PKC $\zeta$  (Palma-Nicolas et al., 2008a), es posible especular que la activación transitoria de Akt induce la fosforilación inicial de la GSK-3 $\beta$ , mientras que la activación de mayor duración de la PKC $\zeta$  inducida por la trombina podría ser responsable de la fosforilación sostenida de GSK-3 $\beta$  y la consiguiente estabilización de la ciclina D1.

La activación del señalamiento de las PKC, de ERK1-2 y de Akt, así como la expresión de c-fos son fenómenos clave en la proliferación inducida por la trombina en varios tipos celulares (Cao et al., 2006; Kim et al., 2004; Minhajuddin et al., 2009; Nicole et al., 2005) y se ha demostrado que, tanto la activación de dichas cinasas, como la expresión de c-fos, está aumentada en patologías proliferativas, tales como el cáncer (Carnero, 2010; Matheny and Adamo, 2009).

En este trabajo se demostró que la trombina promueve la acumulación de la ciclina D1 por, al menos, tres mecanismos moleculares diferentes: primero, la trombina promueve la activación de las cPKC; segundo, la trombina induce la actividad de ERK1-2, el señalamiento de estas dos vías converge en la expresión de c-fos, lo que conduce a la síntesis de ciclina D1; tercero, la trombina dispara el señalamiento de la vía PI3K/PDK1/Akt y, en consecuencia, la inactivación de la GSK-3 $\beta$ , lo cual promueve de manera indirecta la estabilización de la ciclina D1. Finalmente la acumulación de la ciclina D1 conduce a la progresión del ciclo celular y el aumento de la proliferación celular en el EPR (Fig. 20).

Dado que la proliferación es un fenómeno clave en el desarrollo de enfermedades fibroproliferativas en el ojo, nuestro trabajo aporta información para el desarrollo de estrategias dirigidas a la prevención y el tratamiento de patologías oculares proliferativas, que son una causa importante de ceguera.



**Fig. 20 Esquema de los mecanismos moleculares por los cuales la trombina promueve la proliferación de las células del EPR.** La trombina promueve la acumulación de la ciclina D1 por, al menos, tres mecanismos moleculares diferentes: primero, la trombina promueve la activación de las cPKC; segundo, la trombina induce la actividad de ERK1-2, el señalamiento de estas dos vías converge en la expresión de c-fos, lo que conduce a la síntesis de ciclina D1; tercero, la trombina dispara el señalamiento de la vía PI3K/PDK1/Akt y, en consecuencia, la inactivación de la GSK-3 $\beta$ , lo cual promueve de manera indirecta la estabilización de la ciclina D1. Finalmente la acumulación de la ciclina D1 conduce a la progresión del ciclo celular y el aumento de la proliferación celular en el EPR.

## 8. Conclusión

Se ha propuesto que la ruptura de la barrera hematorretiniana es el principal factor de riesgo para el establecimiento de trastornos fibroproliferativos en la retina, debido a que la exposición de los componentes del suero puede inducir la proliferación y migración descontroladas de las células del EPR. Dado que la trombina (componente principal del suero) promueve la proliferación celular mediante la activación de distintas vías de señalamiento en diversos tipos celulares, en este trabajo se investigó el efecto de la trombina sobre la activación de vías de señalamiento que controlan la expresión de proteínas clave en la progresión del ciclo celular. Los resultados de este trabajo demostraron que:

1. La trombina induce la expresión y estabilización de la proteína ciclina D1, lo que genera la acumulación y la localización nuclear de dicha proteína y promueve, en consecuencia, la progresión del ciclo celular y la proliferación en el EPR de rata.
2. La trombina promueve la expresión bifásica de c-fos a través de la activación de las vías de señalamiento PI3K/ERK1-2 y PLC $\beta$ /PKC $\alpha$  en el EPR de rata.
3. La trombina induce la activación de la vía de señalamiento Akt/GSK-3 $\beta$  en las células del EPR de rata.
4. La acumulación de la ciclina D1 y la proliferación inducidas por la trombina requiere de la activación de las vías de señalamiento PI3K/ERK1-2, PLC $\beta$ /PKC $\alpha$  y Akt/GSK-3 $\beta$  en el EPR de rata.

Dado que la ciclina D1 juega un papel fundamental en la regulación de la progresión de células a través de las fases G1/S del ciclo celular y que su expresión y acumulación es elevada en células tumorales, nuestros resultados aportan información relevante para el entendimiento de los mecanismos moleculares involucrados en el establecimiento de patologías fibroproliferativas. Adicionalmente, se ha demostrado que la trombina también promueve la migración y modificaciones en el citoesqueleto de actina en las células del EPR (Palma-Nicolas et al., 2008a; Ruiz-Loredo et al., 2011). Dado que la proliferación, la migración y el cambio en el citoesqueleto de actina son fenómenos clave en el desarrollo de enfermedades fibroproliferativas, nuestros resultados sugieren que la trombina podría contribuir al desarrollo de la VRP después de la ruptura de la barrera hematorretiniana.

El tratamiento y la prevención de las enfermedades fibroproliferativas de la retina requieren la determinación de los mecanismos moleculares implicados en su desarrollo, por lo que nuestro

trabajo aporta información para el desarrollo de estrategias dirigidas a la prevención y el tratamiento de patologías oculares proliferativas, que son una causa importante de ceguera.

## 9. Referencias

- Aktas H, Cai H, Cooper GM. 1997. Ras links growth factor signaling to the cell cycle machinery via regulation of cyclin D1 and the Cdk inhibitor p27KIP1. *Mol Cell Biol* 17(7):3850-3857.
- Alessi DR, Cohen P. 1998. Mechanism of activation and function of protein kinase B. *Curr Opin Genet Dev* 8(1):55-62.
- Arayatrakoollikit U, Pavasant P, Yongchaitrakul T. 2008. Thrombin induces osteoprotegerin synthesis via phosphatidylinositol 3'-kinase/mammalian target of rapamycin pathway in human periodontal ligament cells. *J Periodontol Res* 43(5):537-543.
- Baldin V, Lukas J, Marcote MJ, Pagano M, Draetta G. 1993. Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes Dev* 7(5):812-821.
- Beier F, Leask TA, Haque S, Chow C, Taylor AC, Lee RJ, Pestell RG, Ballock RT, LuValle P. 1999. Cell cycle genes in chondrocyte proliferation and differentiation. *Matrix Biol* 18(2):109-120.
- Blagosklonny MV, Pardee AB. 2002. The restriction point of the cell cycle. *Cell Cycle* 1(2):103-110.
- Bode W. 2006. The structure of thrombin: a janus-headed proteinase. *Semin Thromb Hemost* 32 Suppl 1:16-31.
- Borbiev T, Verin AD, Birukova A, Liu F, Crow MT, Garcia JG. 2003. Role of CaM kinase II and ERK activation in thrombin-induced endothelial cell barrier dysfunction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285(1):L43-54.
- Byeon SH, Lee SC, Choi SH, Lee HK, Lee JH, Chu YK, Kwon OW. 2010. Vascular endothelial growth factor as an autocrine survival factor for retinal pigment epithelial cells under oxidative stress via the VEGF-R2/PI3K/Akt. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51(2):1190-1197.
- Cai H, Liu D, Garcia JG. 2008. CaM Kinase II-dependent pathophysiological signalling in endothelial cells. *Cardiovasc Res* 77(1):30-34.
- Cao H, Dronadula N, Rao GN. 2006. Thrombin induces expression of FGF-2 via activation of PI3K-Akt-Fra-1 signaling axis leading to DNA synthesis and motility in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 290(1):C172-182.
- Carnero A. 2010. The PKB/AKT pathway in cancer. *Curr Pharm Des* 16(1):34-44.
- Clack V. 1986. The retina. A model for cell biology studies. New York: Academic Press. 129-168 p.
- Coughlin SR. 2000. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature* 407(6801):258-264.
- Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. 1995. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378(6559):785-789.
- Chang CW, Roque RS, Defoe DM, Caldwell RB. 1991. An improved method for isolation and culture of pigment epithelial cells from rat retina. *Curr Eye Res* 10(11):1081-1086.

- Chang F, Steelman LS, Shelton JG, Lee JT, Navolanic PM, Blalock WL, Franklin R, McCubrey JA. 2003. Regulation of cell cycle progression and apoptosis by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway (Review). *Int J Oncol* 22(3):469-480.
- Chen HJ, Rojas-Soto M, Oguni A, Kennedy MB. 1998. A synaptic Ras-GTPase activating protein (p135 SynGAP) inhibited by CaM kinase II. *Neuron* 20(5):895-904.
- Cheng CK, Fan QW, Weiss WA. 2009. PI3K signaling in glioma--animal models and therapeutic challenges. *Brain Pathol* 19(1):112-120.
- Cheng M, Sexl V, Sherr CJ, Rousset MF. 1998. Assembly of cyclin D-dependent kinase and titration of p27Kip1 regulated by mitogen-activated protein kinase kinase (MEK1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(3):1091-1096.
- Cheng Y, Yan L, Ren X, Yang JM. 2011. eEF-2 kinase, another meddler in the "Yin and Yang" of Akt-mediated cell fate? *Autophagy* 7(6).
- Chung SW, Park JW, Lee SA, Eo SK, Kim K. 2010. Thrombin promotes proinflammatory phenotype in human vascular smooth muscle cell. *Biochem Biophys Res Commun*.
- Darmoul D, Gratio V, Devaud H, Lehy T, Laburthe M. 2003. Aberrant expression and activation of the thrombin receptor protease-activated receptor-1 induces cell proliferation and motility in human colon cancer cells. *Am J Pathol* 162(5):1503-1513.
- Davie EW, Kulman JD. 2006. An overview of the structure and function of thrombin. *Semin Thromb Hemost* 32 Suppl 1:3-15.
- de Rooij J, Zwartkruis FJ, Verheijen MH, Cool RH, Nijman SM, Wittinghofer A, Bos JL. 1998. Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* 396(6710):474-477.
- De Sousa LP, Brasil BS, Silva BM, Freitas MH, Nogueira SV, Ferreira PC, Kroon EG, Bonjardim CA. 2005. Plasminogen/plasmin regulates c-fos and egr-1 expression via the MEK/ERK pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 329(1):237-245.
- Dery O, Corvera CU, Steinhoff M, Bunnett NW. 1998. Proteinase-activated receptors: novel mechanisms of signaling by serine proteases. *Am J Physiol* 274(6 Pt 1):C1429-1452.
- Dorn GW, 2nd, Davis MG. 1992. Thrombin, but not thromboxane, stimulates megakaryocytic differentiation in human megakaryoblastic leukemia cells. *J Pharmacol Exp Ther* 262(3):1242-1247.
- Duronio V. 2008. The life of a cell: apoptosis regulation by the PI3K/PKB pathway. *Biochem J* 415(3):333-344.
- Ellis CA, Malik AB, Gilchrist A, Hamm H, Sandoval R, Voyno-Yasenetskaya T, Tirupathi C. 1999. Thrombin induces proteinase-activated receptor-1 gene expression in endothelial cells via activation of G-linked Ras/mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 274(19):13718-13727.
- Engelman JA, Luo J, Cantley LC. 2006. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet* 7(8):606-619.
- Esmon CT. 2001. Role of coagulation inhibitors in inflammation. *Thromb Haemost* 86(1):51-56.



- Fernald RD. 2004. Evolving eyes. *Int J Dev Biol* 48(8-9):701-705.
- Feutz AC, Barrandon Y, Monard D. 2008. Control of thrombin signaling through PI3K is a mechanism underlying plasticity between hair follicle dermal sheath and papilla cells. *J Cell Sci* 121(Pt 9):1435-1443.
- Fields AP, Frederick LA, Regala RP. 2007. Targeting the oncogenic protein kinase Ciota signalling pathway for the treatment of cancer. *Biochem Soc Trans* 35(Pt 5):996-1000.
- Fuhrmann S. 2010. Eye morphogenesis and patterning of the optic vesicle. *Curr Top Dev Biol* 93:61-84.
- Gardner A, Phillips-Mason PJ, Raben DM, Baldassare JJ. 2002. A novel role for Gq alpha in alpha-thrombin-mediated mitogenic signalling pathways. *Cell Signal* 14(6):499-507.
- Girard P, Mimoun G, Karpouzas I, Montefiore G. 1994. Clinical risk factors for proliferative vitreoretinopathy after retinal detachment surgery. *Retina* 14(5):417-424.
- Goel R, Phillips-Mason PJ, Raben DM, Baldassare JJ. 2002. alpha-Thrombin induces rapid and sustained Akt phosphorylation by beta-arrestin1-dependent and -independent mechanisms, and only the sustained Akt phosphorylation is essential for G1 phase progression. *J Biol Chem* 277(21):18640-18648.
- Guertin DA, Sabatini DM. 2007. Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell* 12(1):9-22.
- Gulhati P, Cai Q, Li J, Liu J, Rychahou PG, Qiu S, Lee EY, Silva SR, Bowen KA, Gao T, Evers BM. 2009. Targeted inhibition of mammalian target of rapamycin signaling inhibits tumorigenesis of colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 15(23):7207-7216.
- Guo YL, Peng M, Kang B, Williamson JR. 1997. Inhibition of thrombin-stimulated cell proliferation by ceramide is not through inhibition of extracellular signal-regulated protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 240(2):405-408.
- Gutierrez-Venegas G, Castillo-Aleman R. 2008. Characterization of the transduction pathway involved in c-fos and c-jun expression induced by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* lipopolysaccharides in human gingival fibroblasts. *Int Immunopharmacol* 8(11):1513-1523.
- Ha S, Redmond L. 2008. ERK mediates activity dependent neuronal complexity via sustained activity and CREB-mediated signaling. *Dev Neurobiol*.
- Hackett SF, Singer JH, Leschey KH, Campochiaro PA. 1991. Thrombin is a stimulator of retinal pigment epithelial cell proliferation. *Exp Eye Res* 53(1):95-100.
- Han J, Li L, Hu J, Yu L, Zheng Y, Guo J, Zheng X, Yi P, Zhou Y. 2010. Epidermal growth factor stimulates human trophoblast cell migration through Rho A and Rho C activation. *Endocrinology* 151(4):1732-1742.
- Hay N, Sonenberg N. 2004. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev* 18(16):1926-1945.
- Hecquet C, Lefevre G, Valtink M, Engelmann K, Mascarelli F. 2002. Activation and role of MAP kinase-dependent pathways in retinal pigment epithelial cells: ERK and RPE cell proliferation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43(9):3091-3098.

- Henrikson KP, Salazar SL, Fenton JW, 2nd, Pentecost BT. 1999. Role of thrombin receptor in breast cancer invasiveness. *Br J Cancer* 79(3-4):401-406.
- Hill CS, Wynne J, Treisman R. 1995. The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF. *Cell* 81(7):1159-1170.
- Holtkamp GM, De Vos AF, Peek R, Kijlsta A. 1999. Analysis of the secretion pattern of monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) and transforming growth factor-beta 2 (TGF-beta2) by human retinal pigment epithelial cells. *Clin Exp Immunol* 118(1):35-40.
- Hollborn M, Bringmann A, Faude F, Wiedemann P, Kohen L. 2006. Signaling pathways involved in PDGF-evoked cellular responses in human RPE cells. *Biochem Biophys Res Commun* 344(3):912-919.
- Hollborn M, Petto C, Steffen A, Trettner S, Bendig A, Wiedemann P, Bringmann A, Kohen L. 2009. Effects of thrombin on RPE cells are mediated by transactivation of growth factor receptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50(9):4452-4459.
- Hollenberg MD, Compton SJ. 2002. International Union of Pharmacology. XXVIII. Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev* 54(2):203-217.
- Hollenberg MD, Houle S. 2005. Proteinases as hormone-like signal messengers. *Swiss Med Wkly* 135(29-30):425-432.
- Hurst JH, Hooks SB. 2009. Regulator of G-protein signaling (RGS) proteins in cancer biology. *Biochem Pharmacol* 78(10):1289-1297.
- Illario M, Cavallo AL, Bayer KU, Di Matola T, Fenzi G, Rossi G, Vitale M. 2003. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II binds to Raf-1 and modulates integrin-stimulated ERK activation. *J Biol Chem* 278(46):45101-45108.
- Ishida K, Panjwani N, Cao Z, Streilein JW. 2003. 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* 11(2):91-105.
- Johannes FJ, Prestle J, Eis S, Oberhagemann P, Pfizenmaier K. 1994. PKC $\alpha$  is a novel, atypical member of the protein kinase C family. *J Biol Chem* 269(8):6140-6148.
- Joyce D, Albanese C, Steer J, Fu M, Bouzahzah B, Pestell RG. 2001. NF-kappaB and cell-cycle regulation: the cyclin connection. *Cytokine Growth Factor Rev* 12(1):73-90.
- Kahl CR, Means AR. 2004. Regulation of cyclin D1/Cdk4 complexes by calcium/calmodulin-dependent protein kinase I. *J Biol Chem* 279(15):15411-15419.
- Kandel ES, Hay N. 1999. The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. *Exp Cell Res* 253(1):210-229.
- Karin M, Hunter T. 1995. Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus. *Curr Biol* 5(7):747-757.

- Karlsson R, Pedersen ED, Wang Z, Brakebusch C. 2009. Rho GTPase function in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* 1796(2):91-98.
- Katso R, Okkenhaug K, Ahmadi K, White S, Timms J, Waterfield MD. 2001. Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17:615-675.
- Keenan SM, Lents NH, Baldassare JJ. 2004. Expression of cyclin E renders cyclin D-CDK4 dispensable for inactivation of the retinoblastoma tumor suppressor protein, activation of E2F, and G1-S phase progression. *J Biol Chem* 279(7):5387-5396.
- Kettner C, Shaw E. 1979. D-Phe-Pro-Arg-CH<sub>2</sub>C(1)-A selective affinity label for thrombin. *Thromb Res* 14(6):969-973.
- Kim S, Jin J, Kunapuli SP. 2004. Akt activation in platelets depends on Gi signaling pathways. *J Biol Chem* 279(6):4186-4195.
- Klein EA, Yang C, Kazanietz MG, Assoian RK. 2007. NF-kappaB-independent signaling to the cyclin D1 gene by Rac. *Cell Cycle* 6(9):1115-1121.
- Kolch W, Heidecker G, Kochs G, Hummel R, Vahidi H, Mischak H, Finkenzeller G, Marme D, Rapp UR. 1993. Protein kinase C alpha activates RAF-1 by direct phosphorylation. *Nature* 364(6434):249-252.
- Kong D, Yamori T. 2008. Phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors: promising drug candidates for cancer therapy. *Cancer Sci*.
- Kumar P, Shen Q, Pivetti CD, Lee ES, Wu MH, Yuan SY. 2009. Molecular mechanisms of endothelial hyperpermeability: implications in inflammation. *Expert Rev Mol Med* 11:e19.
- Lavoie JN, L'Allemain G, Brunet A, Muller R, Pouyssegur J. 1996. Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway. *J Biol Chem* 271(34):20608-20616.
- Lee CH, Jeon YT, Kim SH, Song YS. 2007. NF-kappaB as a potential molecular target for cancer therapy. *Biofactors* 29(1):19-35.
- Lee YJ, Han HJ. 2008. Albumin-stimulated DNA synthesis is mediated by Ca<sup>2+</sup>/PKC as well as EGF receptor-dependent p44/42 MAPK and NF-kappaB signal pathways in renal proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 294(3):F534-541.
- Leopoldt D, Hanck T, Exner T, Maier U, Wetzker R, Nurnberg B. 1998. Gbetagamma stimulates phosphoinositide 3-kinase-gamma by direct interaction with two domains of the catalytic p110 subunit. *J Biol Chem* 273(12):7024-7029.
- Li H, Weinstein IB. 2006. Protein kinase C beta enhances growth and expression of cyclin D1 in human breast cancer cells. *Cancer Res* 66(23):11399-11408.
- Liang J, Slingerland JM. 2003. Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression. *Cell Cycle* 2(4):339-345.

- Lin CC, Shyr MH, Chien CS, Wang CC, Chiu CT, Hsiao LD, Yang CM. 2001. Mechanisms of thrombin-induced MAPK activation associated with cell proliferation in human cultured tracheal smooth muscle cells. *Cell Signal* 13(4):257-267.
- Lin CH, Cheng HW, Hsu MJ, Chen MC, Lin CC, Chen BC. 2006. c-Src mediates thrombin-induced NF-kappaB activation and IL-8/CXCL8 expression in lung epithelial cells. *J Immunol* 177(5):3427-3438.
- Liu J, Schuff-Werner P, Steiner M. 2006. Thrombin/thrombin receptor (PAR-1)-mediated induction of IL-8 and VEGF expression in prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 343(1):183-189.
- Liu WH, Chen XM, Fu B. 2000. Thrombin stimulates MMP-9 mRNA expression through AP-1 pathway in human mesangial cells. *Acta Pharmacol Sin* 21(7):641-645.
- Liu Y, Pelekanakis K, Woolkalis MJ. 2004. Thrombin and tumor necrosis factor alpha synergistically stimulate tissue factor expression in human endothelial cells: regulation through c-Fos and c-Jun. *J Biol Chem* 279(34):36142-36147.
- Lukas J, Pagano M, Staskova Z, Draetta G, Bartek J. 1994. Cyclin D1 protein oscillates and is essential for cell cycle progression in human tumour cell lines. *Oncogene* 9(3):707-718.
- Ma XM, Blenis J. 2009. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10(5):307-318.
- Macfarlane SR, Seatter MJ, Kanke T, Hunter GD, Plevin R. 2001. Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev* 53(2):245-282.
- Matheny RW, Jr., Adamo ML. 2009. Current perspectives on Akt activation and Akt-ions. *Exp Biol Med* (Maywood) 234(11):1264-1270.
- Minhajuddin M, Bijli KM, Fazal F, Sassano A, Nakayama KI, Hay N, Plataniotis LC, Rahman A. 2009. Protein kinase C-delta and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt activate mammalian target of rapamycin to modulate NF-kappaB activation and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in endothelial cells. *J Biol Chem* 284(7):4052-4061.
- Moller T, Weinstein JR, Hanisch UK. 2006. Activation of microglial cells by thrombin: past, present, and future. *Semin Thromb Hemost* 32 Suppl 1:69-76.
- Montagne J, Stewart MJ, Stocker H, Hafen E, Kozma SC, Thomas G. 1999. Drosophila S6 kinase: a regulator of cell size. *Science* 285(5436):2126-2129.
- Morris TA, DeLorenzo RJ, Tombes RM. 1998. CaMK-II inhibition reduces cyclin D1 levels and enhances the association of p27kip1 with Cdk2 to cause G1 arrest in NIH 3T3 cells. *Exp Cell Res* 240(2):218-227.
- Muallem S. 1989. Calcium transport pathways of pancreatic acinar cells. *Annu Rev Physiol* 51:83-105.
- Mund M, Rodrigues M. 2006. The Retinal Pigment Epithelium. In: Zinn K, Marmor M, editors. *The Retinal Pigment Epithelium*. London: Harvard University Press. p 45-52.
- Murphy LO, Smith S, Chen RH, Fingar DC, Blenis J. 2002. Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products. *Nat Cell Biol* 4(8):556-564.

- Nagasaki H, Shinagawa K, Mochizuki M. 1998. Risk factors for proliferative vitreoretinopathy. *Prog Retin Eye Res* 17(1):77-98.
- Naor Z, Benard O, Seger R. 2000. Activation of MAPK cascades by G-protein-coupled receptors: the case of gonadotropin-releasing hormone receptor. *Trends Endocrinol Metab* 11(3):91-99.
- Narayanan S. 1999. Multifunctional roles of thrombin. *Ann Clin Lab Sci* 29(4):275-280.
- Neshat MS, Mellingshoff IK, Tran C, Stiles B, Thomas G, Petersen R, Frost P, Gibbons JJ, Wu H, Sawyers CL. 2001. Enhanced sensitivity of PTEN-deficient tumors to inhibition of FRAP/mTOR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(18):10314-10319.
- Neumann M, Naumann M. 2007. Beyond I $\kappa$ Bs: alternative regulation of NF- $\kappa$ B activity. *FASEB J* 21(11):2642-2654.
- Nicole O, Goldshmidt A, Hamill CE, Sorensen SD, Sastre A, Lyuboslavsky P, Hepler JR, McKeon RJ, Traynelis SF. 2005. Activation of protease-activated receptor-1 triggers astrogliosis after brain injury. *J Neurosci* 25(17):4319-4329.
- Nierodzik ML, Karpatkin S. 2006. Thrombin induces tumor growth, metastasis, and angiogenesis: Evidence for a thrombin-regulated dormant tumor phenotype. *Cancer Cell* 10(5):355-362.
- Oriente F, Formisano P, Miele C, Fiory F, Maitan MA, Vigliotta G, Trencia A, Santopietro S, Caruso M, Van Obberghen E, Beguinot F. 2001. Insulin receptor substrate-2 phosphorylation is necessary for protein kinase C zeta activation by insulin in L6hIR cells. *J Biol Chem* 276(40):37109-37119.
- Ouyang W, Li J, Ma Q, Huang C. 2006. Essential roles of PI-3K/Akt/IKK $\beta$ /NF $\kappa$ B pathway in cyclin D1 induction by arsenite in JB6 Cl41 cells. *Carcinogenesis* 27(4):864-873.
- Palma-Nicolas JP, Lopez E, Lopez-Colome AM. 2008a. PKC isoenzymes differentially modulate the effect of thrombin on MAPK-dependent RPE proliferation. *Biosci Rep* 28(6):307-317.
- Palma-Nicolas JP, Lopez E, Lopez-Colome AM. 2008b. PKC isoenzymes differentially modulate thrombin effect on MAPK-dependent RPE proliferation. *Biosci Rep*.
- Paris S, Pouyssegur J. 1991. Mitogenic effects of fibroblast growth factors in cultured fibroblasts. Interaction with the G-protein-mediated signaling pathways. *Ann N Y Acad Sci* 638:139-148.
- Parrales A, Palma-Nicolas JP, Lopez E, Lopez-Colome AM. 2010. Thrombin stimulates RPE cell proliferation by promoting c-Fos-mediated cyclin D1 expression. *J Cell Physiol* 222(2):302-312.
- Pastor JC, de la Rúa ER, Martin F. 2002. Proliferative vitreoretinopathy: risk factors and pathobiology. *Prog Retin Eye Res* 21(1):127-144.
- Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH. 2001. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 22(2):153-183.
- Pertz O. 2010. Spatio-temporal Rho GTPase signaling - where are we now? *J Cell Sci* 123(Pt 11):1841-1850.

- Pestell RG, Albanese C, Reutens AT, Segall JE, Lee RJ, Arnold A. 1999. The cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors in hormonal regulation of proliferation and differentiation. *Endocr Rev* 20(4):501-534.
- Podsypanina K, Lee RT, Politis C, Hennessy I, Crane A, Puc J, Neshat M, Wang H, Yang L, Gibbons J, Frost P, Dreisbach V, Blenis J, Gaciong Z, Fisher P, Sawyers C, Hedrick-Ellenson L, Parsons R. 2001. An inhibitor of mTOR reduces neoplasia and normalizes p70/S6 kinase activity in Pten<sup>+/-</sup> mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(18):10320-10325.
- Puro DG, Mano T, Chan CC, Fukuda M, Shimada H. 1990. Thrombin stimulates the proliferation of human retinal glial cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 228(2):169-173.
- Rahman A, True AL, Anwar KN, Ye RD, Voyno-Yasenetskaya TA, Malik AB. 2002. Galpha(q) and Gbetagamma regulate PAR-1 signaling of thrombin-induced NF-kappaB activation and ICAM-1 transcription in endothelial cells. *Circ Res* 91(5):398-405.
- Ramos-Nino ME, Littenberg B. 2008. A novel combination: ranpirnase and rosiglitazone induce a synergistic apoptotic effect by down-regulating Fra-1 and Survivin in cancer cells. *Mol Cancer Ther* 7(7):1871-1879.
- Rao HV, Thirumangalakudi L, Desmond P, Grammas P. 2007a. Cyclin D1, cdk4, and Bim are involved in thrombin-induced apoptosis in cultured cortical neurons. *J Neurochem* 101(2):498-505.
- Rao HV, Thirumangalakudi L, Desmond P, Grammas P. 2007b. Cyclin D1, cdk4, and Bim are involved in thrombin-induced apoptosis in cultured cortical neurons. *J Neurochem*.
- Resendiz JC, Kroll MH, Lassila R. 2007. Protease-activated receptor-induced Akt activation--regulation and possible function. *J Thromb Haemost* 5(12):2484-2493.
- Rosler OG, Thiel G. 2009. Thrombin induces Egr-1 expression in fibroblasts involving elevation of the intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration, phosphorylation of ERK and activation of ternary complex factor. *BMC Mol Biol* 10:40.
- Roux PP, Blenis J. 2004. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* 68(2):320-344.
- Rozengurt E. 2007. Mitogenic signaling pathways induced by G protein-coupled receptors. *J Cell Physiol* 213(3):589-602.
- Ruiz-Loredo AY, Lopez E, Lopez-Colome AM. 2011. Thrombin promotes actin stress fiber formation in RPE through Rho/ROCK-mediated MLC phosphorylation. *J Cell Physiol* 226(2):414-423.
- Runkle EA, Antonetti DA. 2011. The blood-retinal barrier: structure and functional significance. *Methods Mol Biol* 686:133-148.
- Schmitz AA, Govek EE, Bottner B, Van Aelst L. 2000. Rho GTPases: signaling, migration, and invasion. *Exp Cell Res* 261(1):1-12.

- Schwartz GK, Shah MA. 2005. Targeting the cell cycle: a new approach to cancer therapy. *J Clin Oncol* 23(36):9408-9421.
- Schwartz Z, Carney DH, Crowther RS, Ryaby JT, Boyan BD. 2005. Thrombin peptide (TP508) treatment of rat growth plate cartilage cells promotes proliferation and retention of the chondrocytic phenotype while blocking terminal endochondral differentiation. *J Cell Physiol* 202(2):336-343.
- Sethi G, Sung B, Aggarwal BB. 2008. Nuclear factor-kappaB activation: from bench to bedside. *Exp Biol Med (Maywood)* 233(1):21-31.
- Seymour ML, Zaidi NF, Hollenberg MD, MacNaughton WK. 2003. PAR1-dependent and independent increases in COX-2 and PGE2 in human colonic myofibroblasts stimulated by thrombin. *Am J Physiol Cell Physiol* 284(5):C1185-1192.
- Shaulian E, Karin M. 2001. AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* 20(19):2390-2400.
- Shih CH, Bien MY, Chiang LL, Su CL, Lin CH, Chen BC. 2009. Thrombin induces cyclooxygenase-2 expression via the ERK and NF-kappaB pathways in human lung fibroblasts. *Eur J Pharmacol* 618(1-3):70-75.
- Simo R, Villarroel M, Corraliza L, Hernandez C, Garcia-Ramirez M. 2010. The retinal pigment epithelium: something more than a constituent of the blood-retinal barrier--implications for the pathogenesis of diabetic retinopathy. *J Biomed Biotechnol* 2010:190724.
- Sower LE, Payne DA, Meyers R, Carney DH. 1999. Thrombin peptide, TP508, induces differential gene expression in fibroblasts through a nonproteolytic activation pathway. *Exp Cell Res* 247(2):422-431.
- Sparrow JR, Hicks D, Hamel CP. 2010. The retinal pigment epithelium in health and disease. *Curr Mol Med* 10(9):802-823.
- Strauss O. 2005. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev* 85(3):845-881.
- Swaroop A, Kim D, Forrest D. 2010. Transcriptional regulation of photoreceptor development and homeostasis in the mammalian retina. *Nat Rev Neurosci* 11(8):563-576.
- Takeda H, Matozaki T, Takada T, Noguchi T, Yamao T, Tsuda M, Ochi F, Fukunaga K, Inagaki K, Kasuga M. 1999. PI 3-kinase gamma and protein kinase C-zeta mediate RAS-independent activation of MAP kinase by a Gi protein-coupled receptor. *EMBO J* 18(2):386-395.
- Toker A. 1998. Signaling through protein kinase C. *Front Biosci* 3:D1134-1147.
- Tokunou T, Ichiki T, Takeda K, Funakoshi Y, Iino N, Takeshita A. 2001. cAMP response element-binding protein mediates thrombin-induced proliferation of vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21(11):1764-1769.
- Toualbi-Abed K, Daniel F, Guller MC, Legrand A, Mauriz JL, Mauviel A, Bernuau D. 2008. Jun D cooperates with p65 to activate the proximal kappaB site of the cyclin D1 promoter: role of PI3K/PDK-1. *Carcinogenesis* 29(3):536-543.

- Treininis I, Paterson HF, Hooper S, Wilson R, Marshall CJ. 1999. Activated MEK stimulates expression of AP-1 components independently of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase) but requires a PI3-kinase signal To stimulate DNA synthesis. *Mol Cell Biol* 19(1):321-329.
- Tsang F, Choo HH, Dawe GS, Wong WS. 2002. Inhibitors of the tyrosine kinase signaling cascade attenuated thrombin-induced guinea pig airway smooth muscle cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 293(1):72-78.
- Tsopanoglou NE, Maragoudakis ME. 2004. Role of thrombin in angiogenesis and tumor progression. *Semin Thromb Hemost* 30(1):63-69.
- Usui Y, Okunuki Y, Hattori T, Kezuka T, Keino H, Ebihara N, Sugita S, Usui M, Goto H, Takeuchi M. 2008. Functional expression of B7H1 on retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res* 86(1):52-59.
- Van Obberghen-Schilling E, Chambard JC, Paris S, L'Allemain G, Pouyssegur J. 1985. alpha-Thrombin-induced early mitogenic signalling events and G0 to S-phase transition of fibroblasts require continual external stimulation. *EMBO J* 4(11):2927-2932.
- Vartanian KB, Chen HY, Kennedy J, Beck SK, Ryaby JT, Wang H, Hoying JB. 2006. The non-proteolytically active thrombin peptide TP508 stimulates angiogenic sprouting. *J Cell Physiol* 206(1):175-180.
- Villalonga P, Ridley AJ. 2006. Rho GTPases and cell cycle control. *Growth Factors* 24(3):159-164.
- Vojtek AB, Cooper JA. 1995. Rho family members: activators of MAP kinase cascades. *Cell* 82(4):527-529.
- Wallace VA. 2011. Making a Retina-From the Building Blocks to Clinical Applications. *Stem Cells*.
- Wang H, Reiser G. 2003. Thrombin signaling in the brain: the role of protease-activated receptors. *Biol Chem* 384(2):193-202.
- Whitman M, Downes CP, Keeler M, Keller T, Cantley L. 1988. Type I phosphatidylinositol kinase makes a novel inositol phospholipid, phosphatidylinositol-3-phosphate. *Nature* 332(6165):644-646.
- Wilkins RB, Kulwin DR. 1979. Wendell L. Hughes Lecture. Wound healing. *Ophthalmology* 86(4):507-510.
- Wu JB, Fong YC, Tsai HY, Chen YF, Tsuzuki M, Tang CH. 2008. Naringin-induced bone morphogenetic protein-2 expression via PI3K, Akt, c-Fos/c-Jun and AP-1 pathway in osteoblasts. *Eur J Pharmacol* 588(2-3):333-341.
- Xu YZ, Gao Y, Li PZ, Wang NF, Xu HY, Tong GX. 2006a. [Puerarin suppresses the proliferation of vascular smooth muscle cells and c-fos and bcl-2 protein expression]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 31(6):490-493.
- Xu YZ, Wang NF, Li PZ, Wu X, Ling F, Zhang XW. 2006b. [Effects of puerarin on proliferation of vascular smooth muscle cells induced by thrombin]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 86(7):476-480.
- Yang K, Hitomi M, Stacey DW. 2006. Variations in cyclin D1 levels through the cell cycle determine the proliferative fate of a cell. *Cell Div* 1:32.
- Yano S, Tokumitsu H, Soderling TR. 1998. Calcium promotes cell survival through CaM-K kinase activation of the protein-kinase-B pathway. *Nature* 396(6711):584-587.



- Yu K, Ma P, Ge J, Willey CD, Yang P, Wang Z, Gao Q. 2007. Expression of protein kinase C isoforms in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 245(7):993-999.
- Zenz R, Eferl R, Scheinecker C, Redlich K, Smolen J, Schonhaler HB, Kenner L, Tschachler E, Wagner EF. 2008. Activator protein 1 (Fos/Jun) functions in inflammatory bone and skin disease. *Arthritis Res Ther* 10(1):201.

# Thrombin Stimulates RPE Cell Proliferation by Promoting c-Fos-Mediated Cyclin D1 Expression

ALEJANDRO PARRALES, JOSÉ PRISCO PALMA-NICOLÁS, EDITH LÓPEZ  
AND ANA MARÍA LÓPEZ-COLOMÉ\*

*Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF, Mexico*

The retinal pigment epithelium (RPE) plays an essential role in the maintenance and normal functioning of the neural retina. Alterations in RPE function are involved in several ocular pathologies involving the breakdown of the blood–retina barrier (BRB), which exposes RPE to serum components, thrombin among them. Our previous work has shown that thrombin stimulates the proliferation of RPE cells. We here analyzed the molecular pathways leading to this outcome, in order to support thrombin involvement in proliferative vitreoretinopathy (PVR), a major cause of retinal surgery failure. We demonstrated that thrombin activation of PAR-1 promotes cyclin D1 expression at the transcriptional level by stimulating c-Fos expression, mediated by PI3K, MAPK ERK1/2, and conventional PKC activity. Our results show that ERK activation is necessary but not sufficient for the induction of cyclin D1 expression and proliferation, since the inhibition of PI3K or cPKC prevents this outcome. Analysis of thrombin-activated PAR-1 downstream effectors demonstrated that c-Fos expression by the sustained activation of ERK and c-fos transcription triggers the expression and nuclear translocation of cyclin D1, a key regulator of cell cycle G1/S phase progression leading to proliferation. Evidence here provided contributes to the understanding of the mechanisms involved in proliferative eye diseases and enhances the possibility of controlling pathologies such as proliferative PVR, which eventually lead to blindness.

J. Cell. Physiol. 222: 302–312, 2010. © 2009 Wiley-Liss, Inc.

Under physiological conditions, retinal pigment epithelial (RPE) cells form a monolayer between the neural retina and the choroid which, together with glial cells, contributes to the formation of the blood–retina barrier (BRB) (Mund and Rodrigues, 2006). The breakdown of the BRB which occurs in ocular trauma, diabetic retinopathy, retinal detachment, retinal hemorrhage, or retinal surgery, exposes RPE cells to serum components, thrombin among them (Nagasaki et al., 1998). Upon interaction with serum, RPE cells may proliferate, migrate, and assemble as contractile membranes on both retinal surfaces, which is characteristic of proliferative vitreoretinopathy (PVR), clinically considered as a defective healing process and a major cause of retinal surgery failure (Pastor et al., 2002).

In addition to its role in the coagulation cascade, the serine-protease thrombin has been shown to activate distinct signaling pathways in several cell types, by acting on a small family of G protein-coupled receptors (GPCR) named protease-activated receptors (PARs) with a unique mechanism of activation. The proteolytic cleavage of a specific N-terminal receptor sequence unmasks a new amino acid sequence that functions as a tethered ligand; the interaction of the exposed N-terminal with the receptor extracellular domain activates PARs and the receptor-coupled G proteins. Four members of the PAR family have been described: PAR-1, PAR-3, and PAR-4, activated by thrombin, and PAR-2 activated by trypsin, tryptase, and other trypsin-like proteases. PAR-1, the prototype of this family of GPCR, signals through particular Gq1 $\alpha$ , G12/13 $\alpha$ , and Gi $\alpha$ , which accounts for the pleiotropic action of its ligands (Trejo, 2003). Gq activation by thrombin induces an increase in intracellular inositol-trisphosphate (IP3) and calcium, and the downstream activation of protein kinase C (PKC), phosphoinositide-3 kinase (PI3K), and mitogen-activated protein kinases (MAPKs). The activation of PARs is also coupled to the inhibition of adenylyl cyclase via Gi-like G proteins and, more recently, PAR-1 coupling to G12/13 activation was identified, although the downstream modulation of G12/13

effectors such as Rho and GEFs by PAR-1 stimulation remains largely undefined (Macfarlane et al., 2001).

Within the nervous system, thrombin has been shown to induce morphological changes in neurons and glial cells from the brain (Xi et al., 2003), and also to promote the expression of the cell cycle regulator cyclin D1 in cortical neurons (Rao et al., 2007) as well as the proliferation of brain astrocytes and retinal glia upon BRB breakdown (Puro et al., 1990; Nicole et al., 2005).

Particularly in the RPE, thrombin stimulates phospholipase C $\beta$  (PLC $\beta$ ) activity, and also has been shown to induce cell proliferation in vitro (Palma-Nicolas et al., 2008). Also on this line, studies in human RPE cells have demonstrated that the inhibition of cyclin D1 expression significantly prevents serum-induced proliferation (Hecquet et al., 2002). Based on these data, a role for thrombin in the pathogenesis of proliferative disorders such as PVR may be considered.

The cell cycle is a complex process that controls DNA replication and cell division in response to external mitogenic signals (Yang et al., 2006). Cyclin D1 plays a critical role in the

Contract grant sponsor: Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, Universidad Nacional Autónoma de México;

Contract grant number: IN200209.

Contract grant sponsor: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología;

Contract grant number: CB-80398.

\*Correspondence to: Ana María López-Colomé, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria, México CP 04510, DF, Mexico.  
E-mail: acolome@ifc.unam.mx

Received 20 February 2009; Accepted 1 September 2009

Published online in Wiley InterScience  
(www.interscience.wiley.com.), 21 October 2009.  
DOI: 10.1002/jcp.21951

progression of cells through the G1/S phase restriction point of cell cycle by binding to and activating cyclin-dependent kinases (CDK)-4 or CDK6. This results in the phosphorylation of Rb protein, leading to the activation of the E2F family of transcription factors which, in turn, promote the progression of cells into the S phase. Thus, increased expression of cyclin D1 can enhance cell cycle progression and cell proliferation. Importantly, increased cyclin D1 expression detected in cancer cells has been associated with cellular transformation, growth formation, and tumor therapy resistance (Schwartz and Shah, 2005).

The induction of cyclin D1 expression by mitogenic stimulation is carried by the activation of different signal transduction cascades such as MAPK, PI3K, and PKC pathways (Blagosklonny and Pardee, 2002; Liang and Slingerland, 2003; Li and Weinstein, 2006; Musgrove, 2006). Thrombin activation of PAR-1 stimulates MAPK cascade (Macfarlane et al., 2001). Among the members of the MAPK family, p42/p44 MAPK (ERK1/2) has been typically associated with cell survival, proliferation, and differentiation (Chang and Karin, 2001; Li and Weinstein, 2006). Upon activation in the cytoplasm by tyrosine kinase (RTKs)- or GPCRs (Daub et al., 1997), ERK1/2 translocation to the nucleus is an important regulatory step for mitogen-induced gene expression and cell cycle re-entry to promote proliferation (Brunet et al., 1999). Moreover, alterations within this pathway have been linked to cancer progression (Li and Weinstein, 2006).

Another PAR-1-activated family of kinases related with proliferative diseases is the PI3K family of lipid kinases. Activation of phosphoinositide-dependent kinase I (PDK1) by the PI3K product PIP3, activates Akt (Protein Kinase B), which plays a central role in cell survival and proliferation (Kong and Yamori, 2008). Signaling through both ERK1/2 and PI3K, has been involved in the regulation of the synthesis, stabilization, and degradation of cyclin D1 (Liang and Slingerland, 2003); however, additional signaling enzymes such as PKC, have also been shown to induce cyclin D1 expression and have been implicated in proliferative diseases (Li and Weinstein, 2006). Twelve isoforms of PKC have been characterized to date, and classified as conventional, novel, and atypical, according to structural differences in their regulatory domain (Yu et al., 2007).

In the present study we demonstrate that the activation of PAR-1 by thrombin induces the proliferation of RPE cells as a result of the stimulation of cyclin D1 expression through two distinct pathways: PI3K/ERK1/2 and PLC $\beta$ /conventional PKC, which converge at the activation of c-Fos expression, known to increase cyclin D1 expression by interacting with API consensus site in the gene promoter. Since cyclin D1 is up-regulated in tumor and transformed cells our work provides information essential for understanding the molecular mechanisms involved in RPE proliferative diseases, such as PVR.

## Materials and Methods

### Reagents

All reagents used were cell culture grade. PAR-1 agonist peptide (Ser-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-Pro-Asn-Asp-Lys-Tyr-Glu-Pro-Phe), thrombin, hirudin, and Ro-32-0432 were obtained from Calbiochem (San Diego, CA); wortmannin and actinomycin D were from Sigma (St. Louis, MO), and U0126 was from Tocris (Ellisville, MO). PAR-3 (Ser-Phe-Asn-Gly-Gly-Pro) and PAR-4 (Gly-Tyr-Pro-Gly-Lys-Phe) agonist peptides were obtained from Bachem (Torrance, CA). Serum-free DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA) was used as the standard medium for all assays.

### Cell culture

RPE cells were isolated from 8- to 10-day-old Long Evans rat (Chang et al., 1991). The eyes were enucleated from anesthetized

rats, rinsed in Dulbecco modified Eagle medium (DMEM, Gibco BRL, Invitrogen, Carlsbad, CA) containing 0.0125% penicillin and streptomycin, 0.025% neomycin, and 0.01% nystatin (Gibco BRL), and incubated in DMEM containing 2% dispase for 30 min at 37°C. After removing the sclera, RPE was detached from the neural retina and the choroid in calcium- and magnesium-free Hanks' balanced salt solution (HBSS), incubated in the presence of 0.1% trypsin-EDTA, (Gibco) for 2 min, and mechanically dissociated using a Pasteur pipette. Trypsin digestion was stopped by 4% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL) addition. Cells were separated by centrifugation for 5 min at 2,000 rpm, suspended in OptiMEM containing 4% FBS, and seeded in six-well plates at  $3 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> density. After 4 days in the presence of FBS, medium was replaced by serum-free DMEM for 48 h in order to synchronize the cells. All experiments were performed in synchronized cultures.

The identity of RPE cells in culture was established by RPE65 immunoreactivity (Strauss, 2005) showing that 99.1% of rat RPE cells in culture express the biochemical marker RPE65 protein (not shown).

### Viability assay

The viability of RPE cells was tested by trypan blue exclusion in cultures maintained either in the presence of serum or in serum-free medium for 24 and 48 h. After dissociating and separating the cells as described above, trypan blue (0.08%) was added to cells in serum-free DMEM. Trypan-stained and live cells were counted by optical microscopy in a Neubauer chamber and viability was expressed as % of live cells referred to the total number of cells. Comparison of cell viability in cultures containing serum and those deprived from serum for 24 or 48 h showed that starvation does not affect cell viability compared to control cultures in the presence of serum. Control cultures have 78% of viable cells, whereas serum-deprived cultures for 24 and 48 h have 80% and 73% of viable cells.

### RPE cell proliferation measurement

RPE cells were cultured for 96 h in 4% FBS-supplemented OptiMEM. In order to synchronize the cells, cultures for every experiment were serum deprived for 48 h prior to stimulation with thrombin (0–4 U/ml), carried in serum-free DMEM. RPE cell proliferation was assessed by [<sup>3</sup>H] thymidine incorporation into cells maintained in DMEM containing 0.2  $\mu$ Ci/ml [<sup>3</sup>H] thymidine (PerkinElmer, Waltham, MA; 16 Ci/mmol) for 24 h. Following stimulation, cultures were rinsed twice in phosphate-buffered saline (PBS), incubated with 10% trichloroacetic acid for 1 h, solubilized in 0.5% sodium dodecyl sulfate (SDS), and counted for radioactivity in a liquid scintillation counter (Beckman, Fullerton, CA).

### Fluorescence-activated cell sorter (FACS) analysis

The cultures were incubated with thrombin (4 U/ml) for 18 or 22 h. The cells were then dissociated in trypsin/EDTA, pelleted by centrifugation, and suspended in serum-free DMEM. Subsequently, cells were fixed in 70% ice-cold ethanol in PBS, pelleted by centrifugation and suspended in ice-cold PBS. Freshly prepared nuclei staining buffer (100 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% NP-40, 3 mM propidium iodide (PI), and 100  $\mu$ g/ml DNase-free RNase) was added to the cell suspension and incubation was carried for 1 h at 37°C. Cell cycle histograms were generated after analyzing the PI-stained cells by FACS (FACScalibur 1600). Twenty thousand events were recorded for each sample. The samples were analyzed using FlowJo 7.5, Engine 2.15000 software.

### Quantification of cyclin D1 and c-fos mRNA

Real-time RT-PCR was used for measuring cyclin D1 and c-fos mRNA expression (Higuchi et al., 1992). Total RNA was isolated using Trizol reagent (Invitrogen) and treated with DNase I (Invitrogen), according to the manufacturer's protocol. EDTA (2.5 mM) was added to RNA samples for DNase inactivation. mRNA retrotranscription was performed using 1 µg of total RNA, 100 U of Murin Moloney Leukemia Virus retrotranscriptase (MMLV-RT, Invitrogen), 10 U of RNase inhibitor (RNaseout, Invitrogen), 0.25 µg of oligo dT primer (Invitrogen), in the manufacturer's recommended buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM dithiothreitol, DTT). RT reaction was carried for 10 min at 80°C, 60 min at 42°C, and 15 min at 75°C, followed by incubation with RNase H (0.2 U, Invitrogen) for 30 min at 37°C. cDNA was used as substrate for real-time PCR with specific cyclin D1 (5'-TGGAGCCCTGAAGAAG-3' and 5'-AAGTGCCTTGTGCGGTAGC-3') and c-fos (5'-AGATACGCTCCAAGCGGAGA-3' and 5'-CAGTCAAGTCCAGGGAGGTC-3') oligonucleotides. PCR reaction was performed using 2.5 U of recombinant Taq Polymerase (Invitrogen), 0.4 mM of each oligonucleotide and dNTPs, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, in manufacturer's recommended buffer (Tris-HCl 20 mM, pH 8.4, KCl 50 mM) and Syto 9 (0.2 µM, Invitrogen). PCR reaction was carried at 94°C for 2 and 35 cycles at 94°C for 30 sec, 60°C for 30 sec, and 72°C for 45 sec. Quantitative analysis of cDNA amplification was performed using the rotor gene 6000 system (Corbett Life Science, San Francisco CA), and values were normalized to control. Actin amplification was used as loading control. When tested, enzyme inhibitors were added 1 h prior to thrombin stimulation.

### PARs expression

To determine PARs expression total RNA isolation and mRNA retrotranscription was performed as previously described. cDNA amplification was carried using specific oligonucleotides to PAR-1 (5'-atggggcccgccgcttgctg-3' and 5'-agctagtagctttttgtatat-3'), PAR-3 (5'-atggagatgaaagtccttacc-3' and 5'-cgagtcagctgatctacaat-3'), and PAR-4 (5'-atgctcgggtccagcatcagc-3' and 5'-cagaagtgtaggaggacaat-3'). Standard PCR reaction was performed using 2.5 U of recombinant Taq Polymerase, 0.4 mM of each oligonucleotide and dNTPs, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> in manufacturer's recommended buffer and the reaction was carried at 94°C for 2 and 35 cycles at 94°C for 30 sec, 60°C for 30 sec, and 72°C for 45 sec. Amplification of PARs cDNA was carried out using Mastercycler personal (Eppendorf, Westbury, NY).

### Western blot analysis

RPE cells from confluent six-well plates were serum deprived for 48 h and washed three times in PBS. The synchronized cultures were then incubated in thrombin-supplemented serum-free DMEM (2 U/ml) for indicated times. When tested, the indicated inhibitors were added to the culture 1 h prior to stimulation with 2 U/ml thrombin. PAR-1, PAR-3, and PAR-4 agonists were used at 25 µM in serum-free DMEM. Following stimulation, cells were rinsed twice with PBS and disrupted in lysis buffer containing 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, 40 mM β-glycerophosphate, 10 mM sodium pyrophosphate, and 10% of a protease inhibitor cocktail (Sigma).

Protein in the lysates was quantified using Bradford reagent, and 2 µg of total protein was used for cyclin D1 expression analysis. The lysates were solubilized in Laemmli buffer (0.75 M Tris-HCl; pH 8.8, 5% SDS, 20% glycerol, and 0.01% bromophenol blue) and boiled for 5 min. Samples were resolved by 12.5% SDS/PAGE and electro-transferred onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Amersham Biosciences, Pittsburgh, PA). After blocking for 1 h at room temperature with 5% non-fat milk in

Tween-TBS, the PVDF membranes were probed with mouse anti-cyclin D1 primary antibody (Santacruz Biolabs, Santacruz, CA) 1:3,000, or rabbit anti-c-Fos primary antibody (Upstate, Millipore, Billerica, MA), 1:4,000 at 4°C for 24 h. Secondary HRP-conjugated antibody (Zymed Laboratories, Inc.) 1:6,000 was included for 1 h and membranes were developed using the Immobilon Western AP Chemiluminescent Substrate (Millipore, Billerica, MA). Kodak<sup>®</sup> film images were digitized using an Alpha Digi-Doc system (Alpha-Innotech, San Leandro, CA), and densitometric analysis was performed using the Quantity One Software v4.6 from Biorad (Hercules, CA) and normalized to control values. Actin immunodetection was used as loading control.

### Immunofluorescence analysis

RPE cell identity and cyclin D1 nuclear localization were examined in RPE cells seeded on glass coverslips. Synchronization and stimulation were performed as described for Western blotting. After stimulation, cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 20 min, permeabilized using 0.3% Triton X-100 for 20 min, blocked with 10% FBS in 0.1% BSA-PBS for 45 min, and labeled with primary monoclonal antibodies directed against RPE65 at 1:200 dilution, or against cyclin D1 at 1:100 dilution in 0.1% BSA-PBS overnight. Alexa-conjugated secondary antibody against mouse IgG was added at 1:200 dilution in 0.1% BSA-PBS for 2 h. Cells were viewed on a FV1000 Olympus Fluoview confocal microscope (Olympus, Tokyo, Japan).

### 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.

## Results

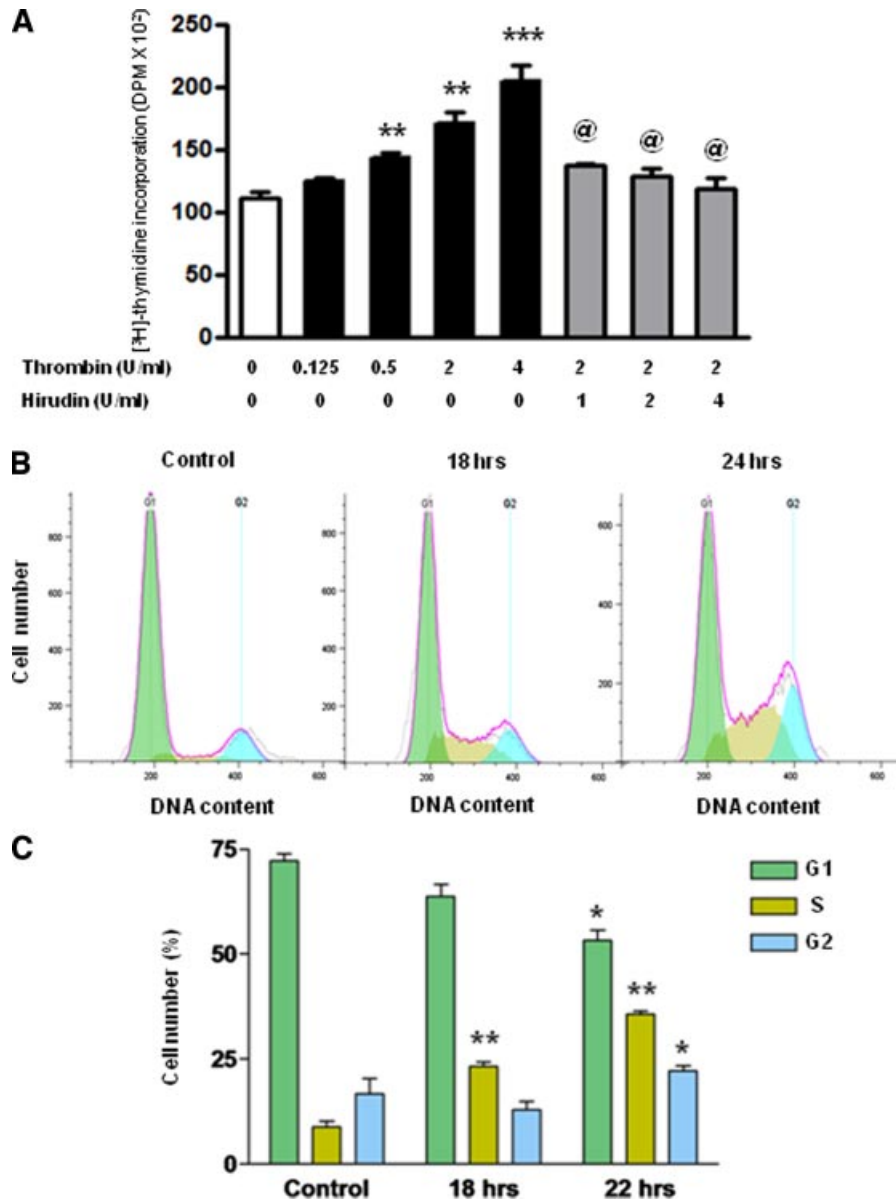
### Thrombin stimulates RPE proliferation

The effect of thrombin on DNA synthesis in RPE cells was determined by [3H]-thymidine incorporation, as indicative of cell division. As shown in Figure 1A, treatment of the cultures with 0.125, 0.5, 2, and 4 U/ml thrombin induced a progressive increase in [3H]-thymidine incorporation (14.6%, 33.3%, 60.7%, and 94.2% respectively), which was inhibited by increasing concentrations of the thrombin inhibitor hirudin (Fig. 1A). Analysis of cell cycle progression by flow cytometry further confirmed the induction of cell proliferation in response to thrombin stimulation. Incubation with thrombin for 18 and 22 h promoted an increase in the percentage of RPE cell population in the S phase of the cell cycle, of 14.2% and 26.49%, respectively (Fig. 1B,C). These results demonstrate that thrombin induces DNA synthesis and RPE cell proliferation in a dose-dependent and -specific manner.

### The activation of PAR-1 by thrombin induces cyclin D1 expression and nuclear localization

Cyclin D1 plays a central role in cell cycle progression and the control of proliferation. An increase in cyclin D1 mRNA levels following growth factor stimulation as a result of mRNA synthesis and stabilization has been observed (Aktas et al., 1997). In order to establish a molecular correlation between thrombin-induced RPE proliferation and cyclin D1 expression, we analyzed thrombin effect on cyclin D1 mRNA and protein expression using real-time RT-PCR and Western blot.

The results showed that following 8 h in the presence of 2 U/ml thrombin, cyclin D1 mRNA expression and cyclin D1 protein are increased by ≈ 125% and returned to control value even in the presence of thrombin (Fig. 2A). The observed effect on cyclin D1 mRNA and protein expression was shown to be



**Fig. 1.** Thrombin induces cell proliferation and cell cycle progression in RPE cells. Cells were serum-starved for 48 h and stimulated with thrombin in presence or absence of hirudin. **A:** [3H]-thymidine incorporation was measured following 24 h in the absence (control) or presence of increasing concentrations of thrombin. When tested, hirudin was included together with thrombin. **B:** Cells were stimulated with 4 U/ml thrombin for 18 or 22 h. Cell cycle progression was analyzed using flow cytometry. Representative FACS data of non-stimulated (control) and thrombin-stimulated RPE cells. **C:** Percentage of cells in G1, S, and G2 phase. The gates were configured manually to determine the percentage of cells in the G1, S, and G2 phases based on DNA content. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM of two independent experiments. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , Student's *t*-test, referred to control. @ $P < 0.01$ , Student's *t*-test, referred to thrombin-stimulated cells. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com).]

specific, since it was prevented by the thrombin inhibitor hirudin (Fig. 2B). To determine whether thrombin-induced cyclin D1 protein expression results from cyclin D1 gene expression or from transcription-independent protein accumulation (stabilization), we tested the effect of the transcription inhibitor actinomycin D on cyclin D1 expression in thrombin-stimulated RPE cells. Results showed that actinomycin D prevents cyclin D1 mRNA and protein expression, suggesting that thrombin induces the transcription and translation of cyclin D1 following 8 h stimulation (Fig. 2C). Since the translation time for protein transcripts has been set between 20 sec and several minutes, the apparent simultaneous

expression of mRNA and protein could be ascribed to the particular properties of cyclin D1 protein translation, unknown to date (Frank, 2000).

In order to identify the specific receptor mediating thrombin effect, we analyzed PAR expression by rat RPE cells using RT-PCR. Our results showed that rat RPE cells express PAR-1 and PAR-3 receptors, but do not express PAR-4 (Fig. 3A). As shown for thrombin, the inclusion of PAR-1 agonist for 8 h induced cyclin D1 expression, whereas the individual or joint addition of PAR-3 and PAR-4 agonists had no effect. This result demonstrates that thrombin promotes cyclin D1 expression by activating PAR-1 (Fig. 3B).

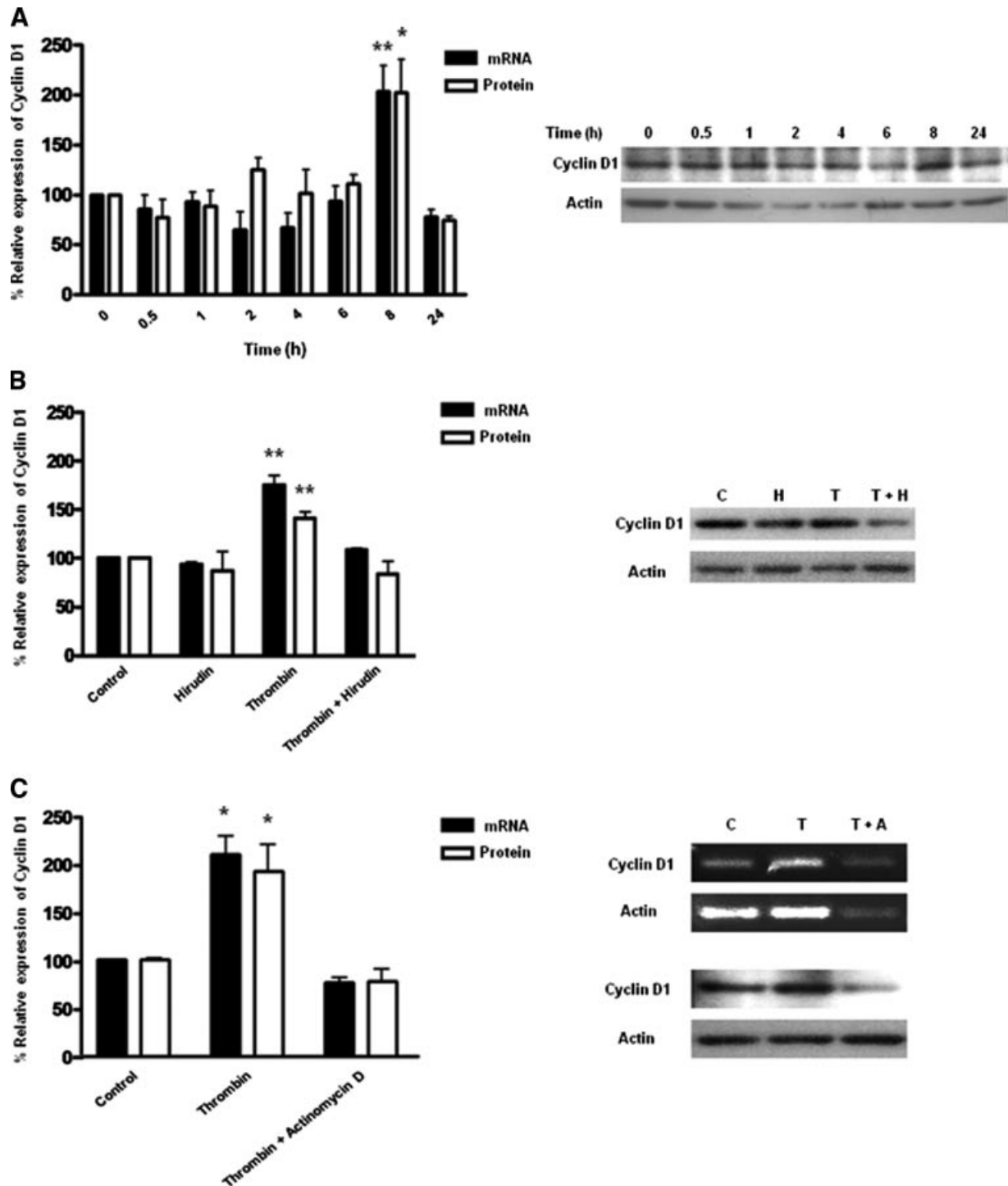
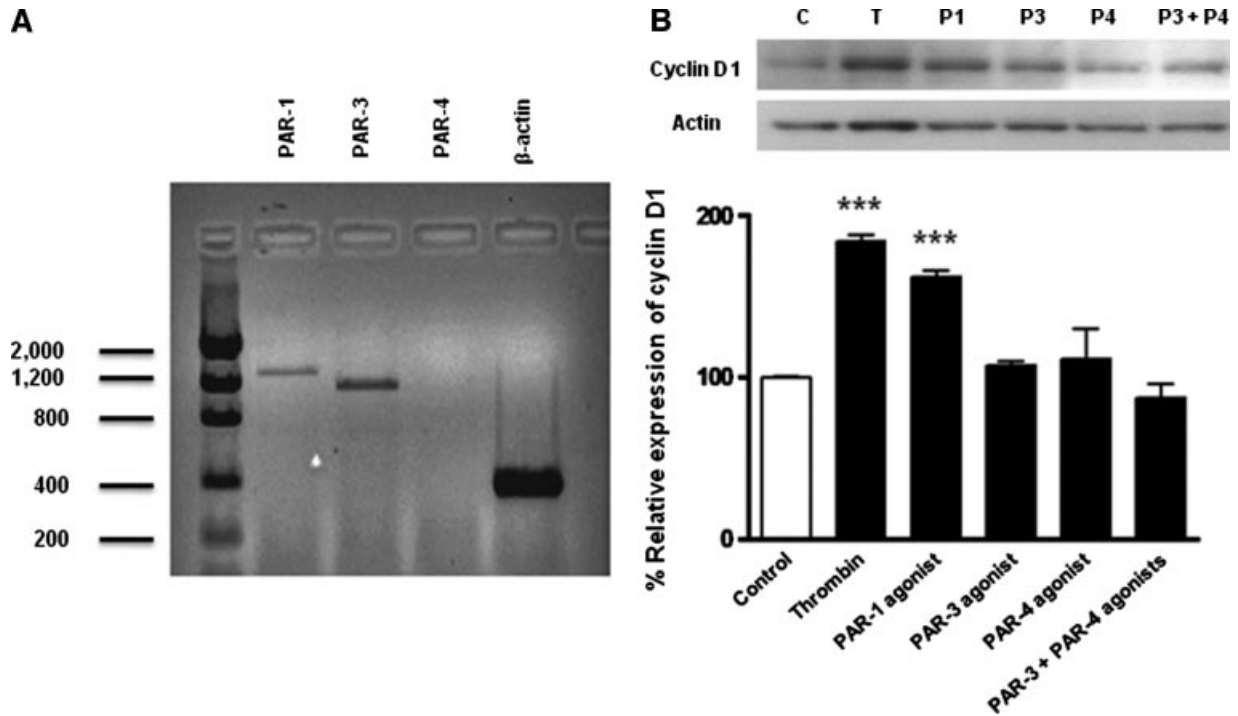
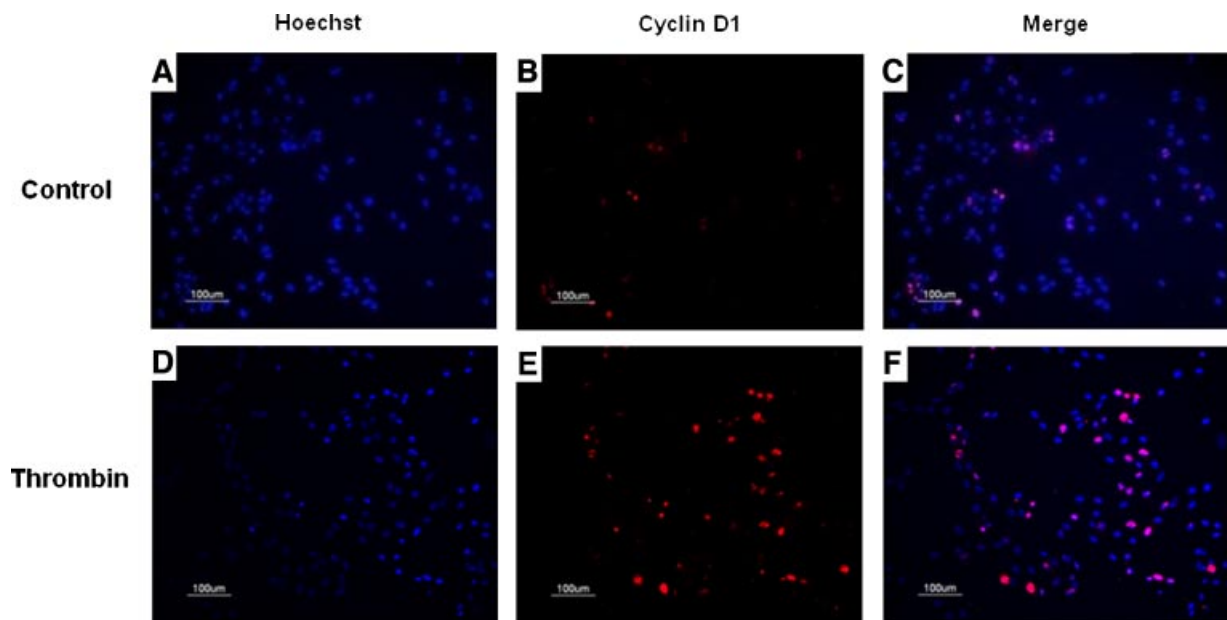


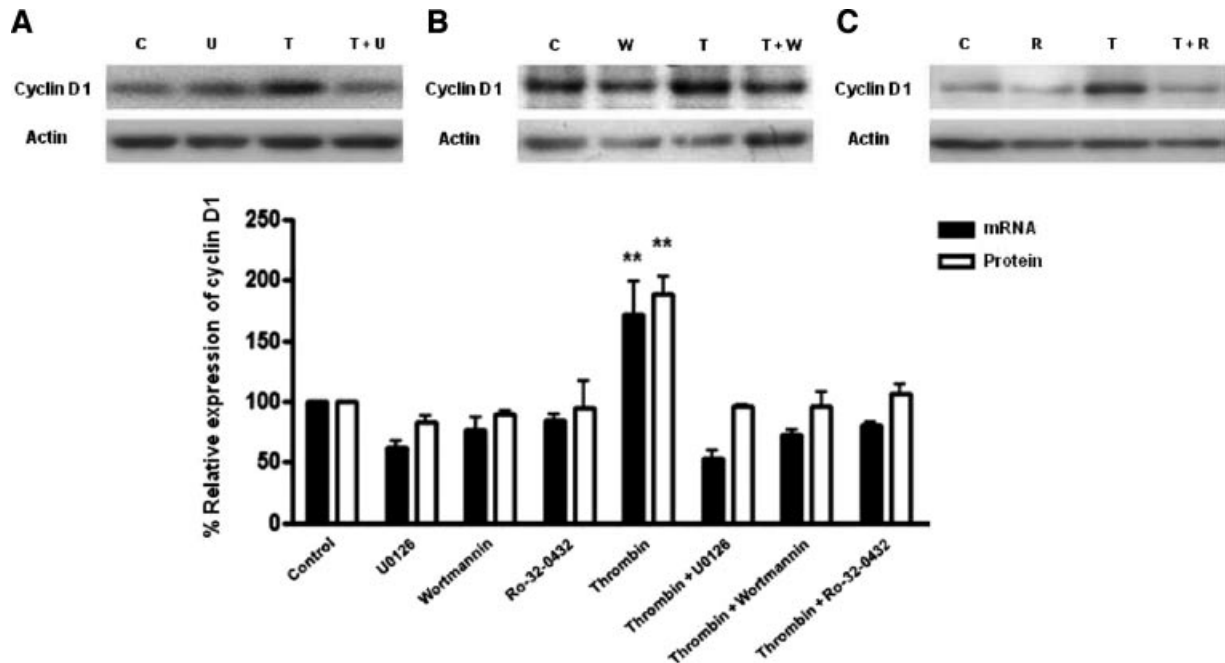
Fig. 2. Thrombin stimulates cyclin D1 mRNA and protein expression in RPE cells. Cells were serum-starved for 48 h and stimulated with 2 U/ml thrombin for the indicated period of time. The relative expression of cyclin D1 was measured by real-time RT-PCR and Western blot, as described in the Materials and Methods Section. A: Thrombin stimulates cyclin D1 mRNA and protein expression following 8 h treatment (B). The induction of cyclin D1 mRNA and protein expression was prevented by hirudin (4 U/ml) C: Inhibition of transcription by actinomycin D (20  $\mu$ M) prevents thrombin-induced cyclin D1 protein expression. panels on the right depict mRNA (top) and protein (bottom) expression from a representative experiment. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM of six (A) or three (B,C) independent experiments. \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01, Student's *t*-test, referred to control.



**Fig. 3.** Thrombin induces cyclin D1 expression in RPE cells through PAR-1 activation. **A:** Expression of PARs in RPE cells. PAR-1, -3, and 4 expression in RPE cells was analyzed by RT-PCR. **B:** Cells were stimulated with thrombin (2 U/ml) or with agonist peptides for PAR-1 (25  $\mu$ M), PAR-3 (25  $\mu$ M), and PAR-4 (25  $\mu$ M), or by the joint inclusion of PAR-3 and PAR-4 agonists for 8 h. Cyclin D1 protein was measured by immunodetection of PAGE bands, as described in Materials and Methods Section. Thrombin stimulation of cyclin D1 expression was mimicked by the PAR-1 agonist, whereas agonists for PAR-3 and PAR-4 showed no effect. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \*\*\* $P$  < 0.001, Student's *t*-test, referred to control.



**Fig. 4.** Thrombin induces nuclear cyclin D1 localization in RPE cells. Cells were serum-starved 48 h and stimulated with 2 U/ml thrombin for 8 h. Cyclin D1 localization was assessed by immunocytochemistry, as described in the Materials and Methods Section. **A:** Significant increase in nuclear cyclin D1 expression was observed following 8 h in the presence of thrombin. **(A,D):** Hoechst nuclei staining. **(B,E):** Cyclin D1 immunoreactivity. **(C,F):** Merge image of Hoechst and cyclin D1. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com).]



**Fig. 5.** Thrombin-induced cyclin D1 expression requires the activation of PI3K, ERK1/2, and cPKCs. Cells were serum-starved 48 h and stimulated with 2 U/ml thrombin for 8 h in the absence or presence of the MEK1/2 inhibitor U0126 (30  $\mu$ M), the PI3K inhibitor wortmannin (100 nM) or the conventional PKC inhibitor Ro-32-0432 (20  $\mu$ M). Relative expression of cyclin D1 mRNA and protein was measured by RT-PCR and Western blot. Pretreatment with U0126 (A), wortmannin (B), or Ro-32-0432 (C) prevented thrombin induced increase in cyclin D1 immunoreactivity. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \*\* $P < 0.01$ , Student's *t*-test, compared to control.

The progression from the G1 to the S phase of the cell cycle requires cyclin D1 nuclear localization (Baldin et al., 1993). Results in Figure 4 show that in addition to the stimulation of cyclin D1 expression, thrombin also induced cyclin D1 translocation to the nucleus.

#### Thrombin-induced cyclin D1 expression requires MEK/ERK activation

Cyclin D1 expression and cell cycle progression induced by thrombin and growth factors in different cell types has been shown to differentially depend on the transient or sustained activation of ERK (Lavoie et al., 1996; Weber et al., 1997; Murphy et al., 2002).

In order to determine whether thrombin-induced cyclin D1 expression requires the activation of the MEK/ERK1/2 pathway in RPE cells, we used the pharmacological inhibition of MEK by the specific inhibitor U0126. Results from these experiments showed that MEK/ERK inhibition by U0126 prevented cyclin D1 mRNA and protein increase (Fig. 5A). This result demonstrates that the activation of ERK1/2 is required for thrombin induction of cyclin D1 expression in RPE cells, in keeping with previous data showing that thrombin-induced RPE proliferation is prevented by U0126 (Palma-Nicolas et al., 2008).

#### PI3K activation is required for thrombin-induced cyclin D1 expression

GPCR stimulation has been shown to activate MEK1/2 by a mechanism involving the activation of PI3K $\gamma$  carried by the G-protein  $\beta\gamma$  subunit. Particularly, PAR-1 activation has been shown to trigger the PI3K/PDK1/Akt signaling cascade, which plays a key role in cell proliferation (Katso et al., 2001; Resendiz et al., 2007). To determine if the activation of ERK by PI3K is required for thrombin effect on cyclin D1 expression in RPE we

analyzed the effect of the PI3K inhibitor wortmannin on cyclin D1 expression in thrombin-stimulated (8 h) cells. Results in Figure 5B show that inhibition of PI3K completely prevented thrombin-induced cyclin D1 mRNA and protein increase, suggesting that PI3K activation upstream MEK is necessary for thrombin-induced cyclin D1 expression.

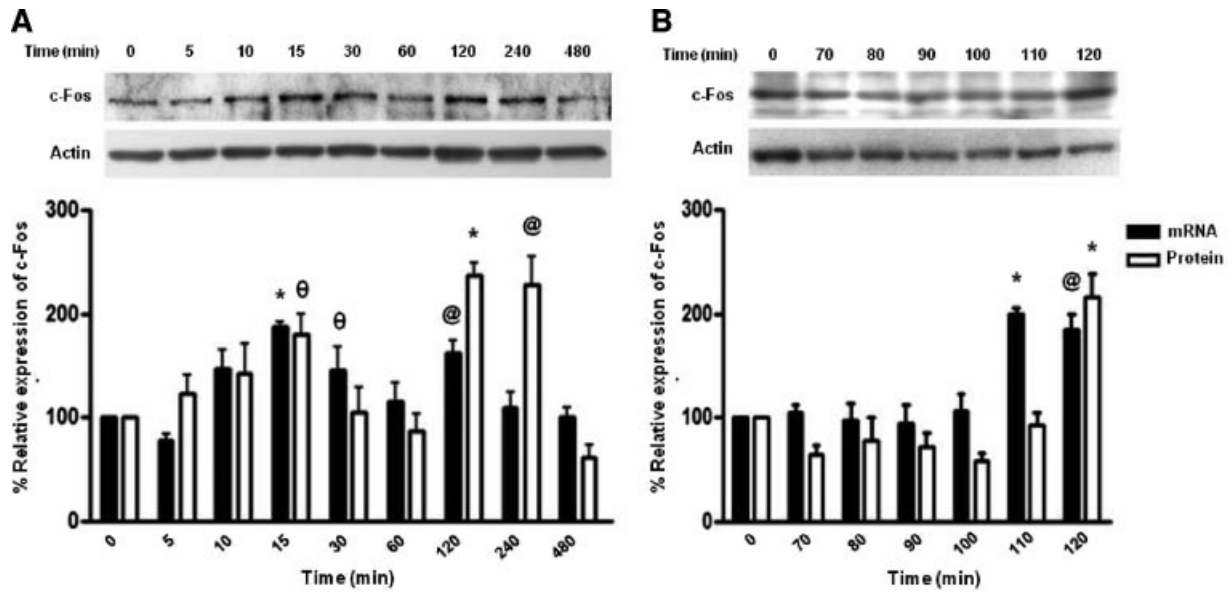
#### Conventional PKC isoforms are involved in thrombin-induced cyclin D1 expression

In addition to the  $\beta\gamma$  subunit induced activation of PI3K, PAR-1-coupled  $G\alpha_q$  induces diacylglycerol (DAG) and  $Ca^{2+}$  increase as a result of PLC $\beta$  activity in RPE cells (Palma-Nicolas et al., 2008), which are known to activate conventional PKC isoforms (cPKC: PKC $\alpha$ , PKC $\beta$ I, PKC $\beta$ II, and PKC $\gamma$ ) in a synergic fashion. We tested the effect of the PKC inhibitor Ro-32-0432, and showed that the inhibition of cPKC (and novel  $\epsilon$ ) isoforms prevents thrombin-induced cyclin D1 mRNA and protein expression (Fig. 5C), indicating that cPKC activation is required for thrombin effect. This result suggests that thrombin activation of PI3K, ERK, and cPKC converge at the induction of cyclin D1 gene transcription, in agreement with results on thrombin-induced RPE proliferation (Palma-Nicolas et al., 2008).

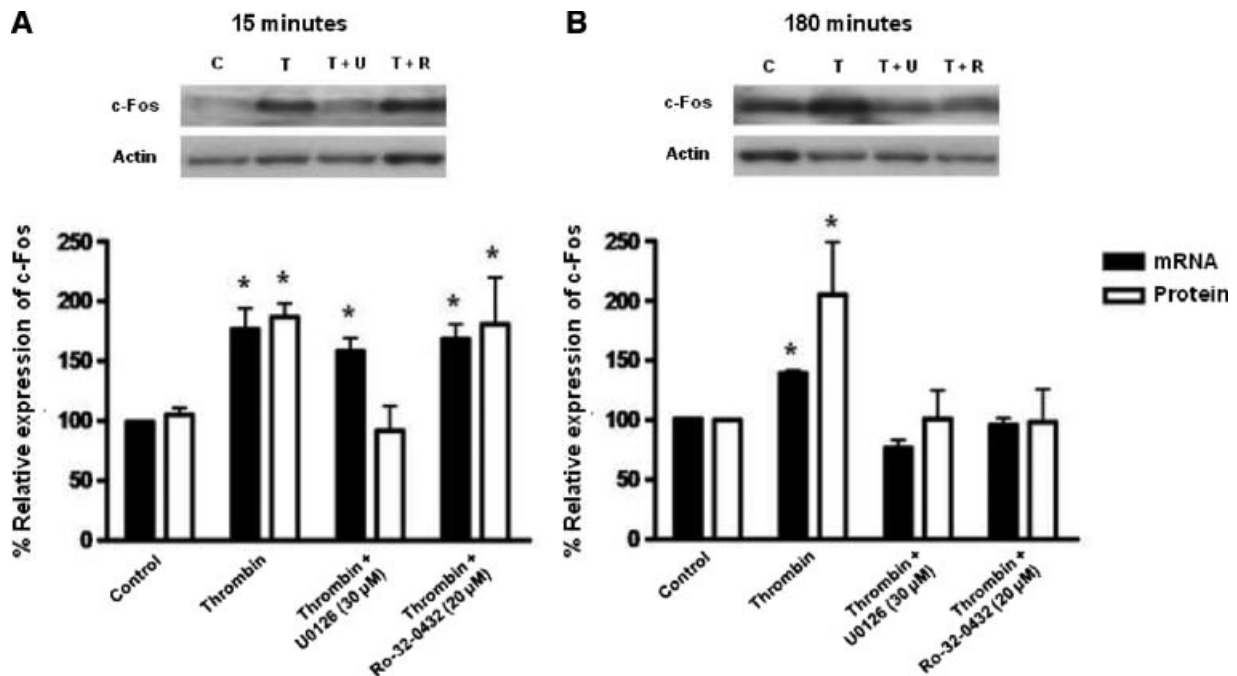
#### Thrombin induces the biphasic expression of c-Fos

The cyclin D1 promoter contains binding sequences for distinct transcription factors that are activated by the PI3K, ERK1/2, and PKC signaling pathways (Gutierrez-Venegas and Castillo-Aleman, 2008). Since thrombin promoted the transcription of the cyclin D1 gene (Fig. 2), in order to determine whether this effect relates to changes in the level of c-Fos, we measured c-Fos mRNA and protein expression following stimulation. Results in Figure 6A show that thrombin induces the biphasic expression of c-Fos mRNA and protein, peaking at 15 and





**Fig. 6.** Thrombin induces the expression of c-Fos mRNA and protein in a biphasic manner. Cells were serum-starved 48 h and stimulated with 2 U/ml thrombin for the indicated period of time. The relative expression of c-fos was measured by real-time RT-PCR and Western blot. **A:** Thrombin induces a biphasic increase in c-fos mRNA and c-Fos protein expression at 15 and 120 min stimulation. **B:** c-fos mRNA expression from 70 to 120 min after thrombin stimulation. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM of six independent experiments. \* $P < 0.05$ , @ $P < 0.01$ , \* $P < 0.001$ , Student's t-test, compared to control.



**Fig. 7.** Early and late induction of c-fos expression by thrombin require the differential activation of ERK 1/2 and cPKC. Cell culture and thrombin stimulation protocol were followed as described in Materials and Methods Section. **A:** c-Fos expression at 15 min. Whereas neither MEK inhibition by U0126 nor that of cPKC by Ro-32-0432 prevented c-fos mRNA expression, c-Fos protein increase was prevented by U0126. **B:** c-Fos expression at 180 min. In contrast to early expression, the late expression of c-Fos mRNA and protein were prevented by U0126 and Ro-32-0432, indicating the requirement of MEK and cPKC for this effect. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \* $P < 0.05$ , Student's t-test, compared to control.

120 min stimulation. A closer time-course analysis of c-Fos mRNA and protein expression revealed that although transcription and translation peak following 120 min stimulation by thrombin, the induction of c-Fos mRNA is observed at 110 min, prior to c-Fos protein increase at 120 min stimulation (Fig. 6B). Since c-fos transcript half-life has been shown to be of 10–15 min (Chen et al., 2008), this result suggests that thrombin increases c-Fos protein by stimulating transcriptional activity.

### Thrombin-induced c-Fos expression requires ERK1/2 and cPKC activity

We next investigated if the activation of ERK1/2 and cPKC signaling was responsible for the induction of c-Fos mRNA and protein expression by thrombin.

Results demonstrate that whereas the inhibition of MEK by U0126 prevented c-Fos protein increase at 15 and 120 min (Fig. 7 A,B), the specific inhibition of cPKCs by Ro-32-0432 exclusively prevents the late peak of thrombin-induced c-Fos expression. Surprisingly, although thrombin-induced c-Fos mRNA expression paralleled that of its cognate protein, neither the inhibition of MEK nor that of cPKC prevented the early (15 min) expression peak (Fig. 7A). By contrast, both U0126 and Ro-32-0432 suppressed the increase in mRNA following 180 min stimulation by thrombin (Fig. 7B).

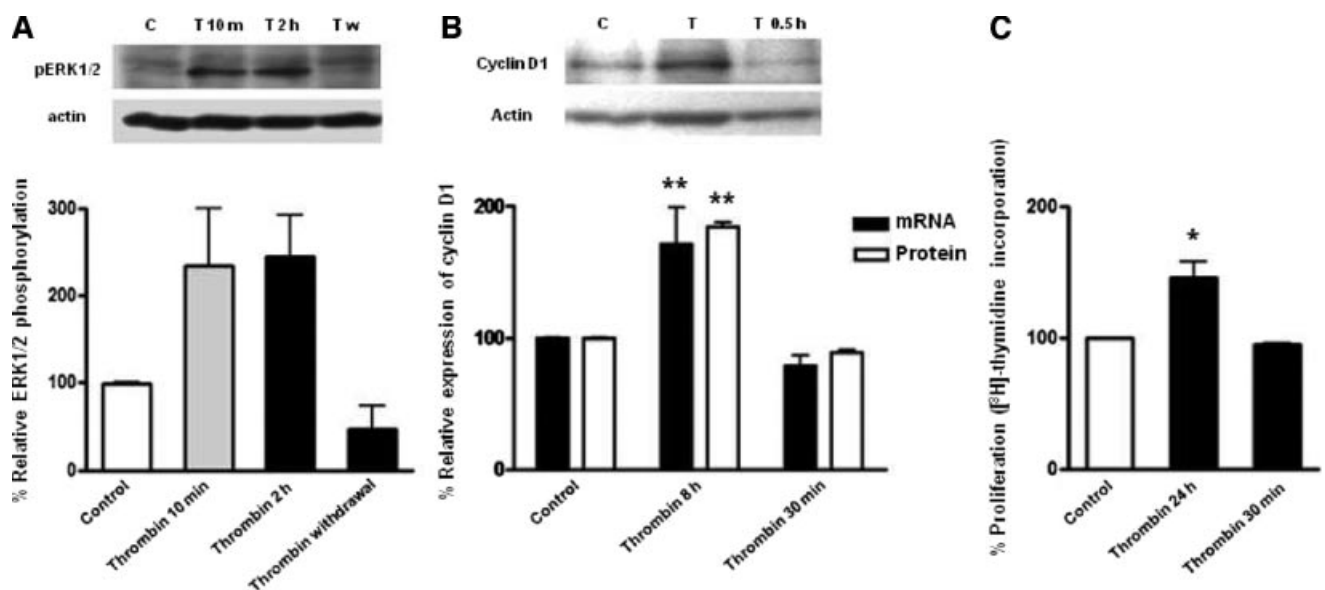
In order to investigate if sustained stimulation by thrombin is required for the induction of cyclin D1 expression and proliferation, we analyzed the effect of thrombin withdrawal following 30 min stimulation (which surpasses early c-fos induction) on ERK activation (Fig. 8A), cyclin D1 expression (Fig. 8B) and cell proliferation (Fig. 8C). Results showed that thrombin effect on all three responses was prevented in this condition, suggesting that the late peak of thrombin-induced c-Fos protein expression is responsible for cyclin D1 expression and proliferation.

### Discussion

PVR is a major cause of failure in surgery aimed to correct retinal detachment or severe ocular trauma (Pastor et al., 2002). In conditions in which the BRB is compromised, the RPE comes in contact with blood constituents (Nagasaki et al., 1998), the serine-protease thrombin among them. Thrombin has been shown to promote proliferation in different cell types. Cyclin D1 is a key protein involved in the progression of cell cycle, and its expression has been shown to be increased in diverse tumor- and Ras-transformed cells (Baldin et al., 1993; Aktas et al., 1997; Yang et al., 2006). We here analyzed the effect of thrombin on cyclin D1 expression, in order to identify the downstream molecular mechanism leading to thrombin effect on RPE proliferation.

Thrombin effect on multiple physiologic and pathological processes is achieved through the activation of PARs. In the present study we demonstrated that the specific activation of PAR-1 by 8 h thrombin treatment stimulates cyclin D1 mRNA and nuclear protein expression. Moreover, thrombin also induced DNA synthesis and cell cycle progression in RPE cells, consistent with previous data in fibroblasts showing that thrombin increases transcriptional activity (Keenan et al., 2004). Little is currently known about the intracellular signaling pathways and key regulators responsible for the induction of proliferation in otherwise quiescent RPE cells. Several studies mainly performed in fibroblastic cells have determined that ERK1/2 activity is required for cyclin D1 expression and the progression of cell cycle induced by mitogenic stimuli, and also to be required for the expression of the AP-1 family transcription factors c-Fos and c-Jun (Gutierrez-Venegas and Castillo-Aleman, 2008).

Here we show that thrombin-induced cyclin D1 expression in RPE is prevented by the MEK inhibitor U0126, suggesting that thrombin stimulates cyclin D1 expression through the Ras/Raf/MEK1/2/ERK1/2 signaling pathway. However, our results indicated that the activation of ERK is required but insufficient



**Fig. 8.** Sustained thrombin stimulation is required for the induction of cell proliferation and cyclin D1 expression. Cells were serum-starved 48 h and stimulated with 2 U/ml thrombin. **A:** Thrombin addition induces biphasic ERK1/2 activation at 10 and 120 min. Thrombin withdrawal following 15 min stimulation abolishes the late peak of ERK1/2 activation. **B:** Thrombin-induced cyclin D1 expression after 8 h stimulation is prevented by thrombin withdrawal after 30 min of stimulation. **C:** Twenty-four hours thrombin-stimulation enhances cell proliferation. Withdrawal of thrombin after 30 min of stimulation prevents this effect. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments performed in triplicate. \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$ , Student's *t*-test, compared to control. C, control; T 10 m, 10 min thrombin stimulation; T 2 h, 2 h thrombin stimulation; T w, thrombin withdrawal after 15 min of stimulation.

for the induction of cyclin D1 expression, since this effect was suppressed by the inhibition of PI3K (Fig. 5B), known to play a central role in proliferation (Katso et al., 2001; Kong and Yamori, 2008).

On this regard, using inducible-MEK1 transfected fibroblasts, Treinies et al. (1999) have demonstrated that although activation of MEK in quiescent cells results in DNA synthesis, the inhibition of PI3K prevents this effect indicating that direct MEK signaling is itself unable to promote cell cycle G1/S progression mediated by cyclin D1 (Jones and Kazlauskas, 2001; Liang and Slingerland, 2003). In keeping with these findings, our data suggest that thrombin action on PAR-1 may activate the MAPK signaling cascade through GPCR-Gq $\alpha$  subunit (Pearson et al., 2001). Although PI3K activation by the released G $\beta$  $\gamma$  dimer (Leopoldt et al., 1998) could increase cyclin D1 protein by stabilization through Akt-mediated inhibition of glycogen synthase-3 $\beta$ -kinase (GSK-3 $\beta$ ; Liang and Slingerland, 2003), we discarded this possibility, since thrombin stimulation in the presence of wortmannin completely prevented cyclin D1 mRNA increase, indicating that PI3K activation is required for cyclin D1 transcription (Fig. 5B). This result was confirmed by experiments in the presence of Actinomycin D showing that the inhibition of transcription abolishes cyclin D1 mRNA and protein expression in response to thrombin. Although future research is required for determining the molecular mechanism of PI3K action on cyclin D1 expression, thrombin is known to activate the Ras/MAPK cascade through G1/2 coupled to Src and PI3K in endothelial cells, which could be the case for RPE cells (Ellis et al., 1999).

In addition to the MAPK and the PI3K signaling pathways, conventional PKC isoforms (cPKC) have also been shown to increase cyclin D1 mRNA and protein expression (Li and Weinstein, 2006). In RPE cells, thrombin activation of PAR-1 stimulates PLC $\beta$  (Palma-Nicolas et al., 2008), thus, increasing the formation of IP3 and DAG, which may activate cPKC isoforms. The finding that the inhibition of cPKC by Ro-32-0432 prevents thrombin-induced cyclin D1 expression indicates that the activation of PI3K, MAPK ERK1/2, and cPKC is necessary for thrombin induced increase in cyclin D1 expression in rat RPE cells.

The cyclin D1 gene promoter contains consensus elements for AP-1 family of transcription factors, CREB and NF- $\kappa$ B (Shaulian and Karin, 2001). Among these factors, the ERK1/2-dependent regulation of c-Fos and c-Jun expression and DNA binding has been shown to require PI3K/PDK1/Akt signaling (Zenz et al., 2008). Particularly,  $\beta$ 1 and  $\beta$ 2 cPKC isoforms have been shown to induce c-Fos expression, as well as the transcriptional activation of c-Fos-regulated genes (Li and Weinstein, 2006).

We examined the possible role of thrombin on c-fos transcriptional activation and showed that thrombin induces the biphasic expression of c-Fos mRNA and protein. Whereas the early peak in c-Fos expression at 15 min depends on ERK activity alone, the delayed increase in c-Fos expression at 120 min requires the activation of both, ERK1/2 and cPKC.

On this matter, the disruption of sustained ERK1 activity in PDGF-stimulated Chinese hamster embryo fibroblasts has been shown to arrest the progression of cell cycle at G1 (Weber et al., 1997), whereas the sustained activation of ERK correlates with S phase entry (Murphy et al., 2002). In agreement with these findings, we found that the expression of cyclin D1 mRNA and protein requires sustained thrombin stimulation and ERK1/2 expression (Fig. 8), since the late expression of c-Fos is coincident and required for thrombin enhancement of cyclin D1 expression. Since both effects were suppressed by the independent inhibition of MEK or cPKC, we conclude that the activation of both pathways by thrombin may converge on the expression of c-Fos, as has

been recently described for mammary cancer cells (Li and Weinstein, 2006).

An unexpected result from this study was that although the early increase in c-Fos mRNA expression observed at 15 min was not prevented by the inhibition of MEK or cPKC, c-Fos protein increase was ERK dependent, suggesting that thrombin induced early c-Fos mRNA increase and c-Fos protein accumulation are independent processes and could involve at least two different signaling pathways. Although the mechanism responsible for early c-Fos expression remains undetermined, among signals which may lead to this effect, PAR-1-linked G12/13 could promote SRF binding to SRE in c-fos promoter, thus increasing c-fos transcription (Qiu et al., 1995; Soh et al., 1999; Villalonga and Ridley, 2006). Upon translation, c-Fos phosphorylation by ERK1/2, known to stabilize this protein and allow its nuclear accumulation (Murphy et al., 2002), would explain the inhibition of early c-Fos expression by U0126, but not by cPKC inhibitors (Fig. 7).

Findings from this work are in agreement with data showing (1) that transient activation of ERK, although inducing c-fos expression, is insufficient for the stabilization of the c-Fos protein and the triggering of the biological response, which is only attained by c-Fos accumulation due to ERK sustained activation (Murphy et al., 2002), and (2) results showing that mitogenesis triggered by growth factors requires two different phases of signaling involving the activation of MEK and of PI3K (Jones and Kazlauskas, 2001). Our present data further support previous findings showing the biphasic increase in ERK activation induced by thrombin in RPE cells, and the stimulation of proliferation by the sustained activation of ERK signaling.

In summary, we have demonstrated that thrombin activation of PAR-1 induces RPE cell proliferation by increasing cyclin D1 expression through the PI3K/ERK1/2 and the PLC $\beta$ /cPKC signaling cascades, which concur at the induction of c-Fos expression. This in turn, may activate AP-1 element in cyclin D1 promoter, leading to cell cycle progression and increased RPE cell proliferation.

The treatment and prevention of PVR requires the determination of the molecular mechanisms involved in its development. Since cyclin D1 plays a critical role in regulating the progression of cells through the G1/S phase of the cell cycle, our findings provide evidence which may contribute to the prevention of proliferative disorders in RPE cells, such as PVR.

## Acknowledgments

This study was partially supported by grants IN200209 from PAPIIT/UNAM and CB-80398 from CONACyT to A.M.L.C. The authors thank the Research Unit from the "Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana" and Dr. Diana Escalante Alcalde for collaboration.

## Literature Cited

- Aktas H, Cai H, Cooper GM. 1997. Ras links growth factor signaling to the cell cycle machinery via regulation of cyclin D1 and the Cdk inhibitor p27KIP1. *Mol Cell Biol* 17:3850–3857.
- Baldin V, Lukas J, Marcote MJ, Pagano M, Draetta G. 1993. Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes Dev* 7:812–821.
- Blagosklonny MV, Pardee AB. 2002. The restriction point of the cell cycle. *Cell Cycle* 1:103–110.
- Brunet A, Roux D, Lenormand P, Dowd S, Keyse S, Pouyssegur J. 1999. Nuclear translocation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase is required for growth factor-induced gene expression and cell cycle entry. *EMBO J* 18:664–674.
- Chang L, Karin M. 2001. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410:37–40.
- Chang CV, Roque RS, Defoe DM, Caldwell RB. 1991. An improved method for isolation and culture of pigment epithelial cells from rat retina. *Curr Eye Res* 10:1081–1086.
- Chen CY, Ezzeddine N, Shyu AB. 2008. Messenger RNA half-life measurements in mammalian cells. *Methods Enzymol* 448:335–357.
- Daub H, Wallasch C, Lankester A, Herrlich A, Ullrich A. 1997. Signal characteristics of G protein-transactivated EGF receptor. *EMBO J* 16:7032–7044.
- Ellis CA, Malik AB, Gilchrist A, Hamm H, Sandoval R, Voyno-Yasenetskaya T, Tirupathi C. 1999. Thrombin induces proteinase-activated receptor-1 gene expression in endothelial cells via activation of Gi-linked Ras/mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 274:13718–13727.

- Frank J. 2000. The ribosome—A macromolecular machine par excellence. *Chem Biol* 7:R133–R141.
- Gutierrez-Venegas G, Castillo-Aleman R. 2008. Characterization of the transduction pathway involved in c-fos and c-jun expression induced by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* lipopolysaccharides in human gingival fibroblasts. *Int Immunopharmacol* 8:1513–1523.
- Hecquet C, Lefevre G, Valtink M, Engelmann K, Mascarelli F. 2002. Activation and role of MAP kinase-dependent pathways in retinal pigment epithelial cells: ERK and RPE cell proliferation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43:3091–3098.
- Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (NY)* 10:413–417.
- Jones SM, Kazlauskas A. 2001. Growth-factor-dependent mitogenesis requires two distinct phases of signalling. *Nat Cell Biol* 3:165–172.
- Katso R, Okkenhaug K, Ahmadi K, White S, Timms J, Waterfield MD. 2001. Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: Implications for development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17:615–675.
- Keenan SM, Lents NH, Baldassare JJ. 2004. Expression of cyclin E renders cyclin D-CDK4 dispensable for inactivation of the retinoblastoma tumor suppressor protein, activation of E2F, and G1-S phase progression. *J Biol Chem* 279:5387–5396.
- Kong D, Yamori T. 2008. Phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors: Promising drug candidates for cancer therapy. *Cancer Sci* 99:1734–1740.
- Lavoie JN, L'Allemain G, Brunet A, Muller R, Pouyssegur J. 1996. Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway. *J Biol Chem* 271:20608–20616.
- Leopoldt D, Hanck T, Exner T, Maier U, Wetzker R, Nurnberg B. 1998. Gbetagamma stimulates phosphoinositide 3-kinase-gamma by direct interaction with two domains of the catalytic p110 subunit. *J Biol Chem* 273:7024–7029.
- Li H, Weinstein IB. 2006. Protein kinase C beta enhances growth and expression of cyclin D1 in human breast cancer cells. *Cancer Res* 66:11399–11408.
- Liang J, Slingerland JM. 2003. Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression. *Cell Cycle* 2:339–345.
- Macfarlane SR, Seatter MJ, Kanke T, Hunter GD, Plevin R. 2001. Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev* 53:245–282.
- Mund M, Rodrigues M. 2006. The retinal pigment epithelium. In: Zinn K, Marmor M, editors. *The retinal pigment epithelium*. London: Harvard University Press. pp 45–52.
- Murphy LO, Smith S, Chen RH, Fingar DC, Blenis J. 2002. Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products. *Nat Cell Biol* 4:556–564.
- Musgrove EA. 2006. Cyclins: Roles in mitogenic signaling and oncogenic transformation. *Growth Factors* 24:13–19.
- Nagasaki H, Shinagawa K, Mochizuki M. 1998. Risk factors for proliferative vitreoretinopathy. *Prog Retin Eye Res* 17:77–98.
- Nicole O, Goldshmidt A, Hamill CE, Sorensen SD, Sastre A, Lyuboslavsky P, Hepler JR, McKeon RJ, Traynelis SF. 2005. Activation of protease-activated receptor-1 triggers astroglialosis after brain injury. *J Neurosci* 25:4319–4329.
- Palma-Nicolas JP, Lopez E, Lopez-Colome AM. 2008. PKC isoenzymes differentially modulate the effect of thrombin on MAPK-dependent RPE proliferation. *Biosci Rep* 28:307–317.
- Pastor JC, de la Rúa ER, Martin F. 2002. Proliferative vitreoretinopathy: Risk factors and pathobiology. *Prog Retin Eye Res* 21:127–144.
- Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH. 2001. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: Regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 22:153–183.
- Puro DG, Mano T, Chan CC, Fukuda M, Shimada H. 1990. Thrombin stimulates the proliferation of human retinal glial cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 228:169–173.
- Qiu RG, Chen J, McCormick F, Symons M. 1995. A role for Rho in Ras transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:11781–11785.
- Rao HV, Thirumangalakudi L, Desmond P, Grammas P. 2007. Cyclin D1, cdk4, and Bim are involved in thrombin-induced apoptosis in cultured cortical neurons. *J Neurochem* 101:498–505.
- Resendiz JC, Kroll MH, Lassila R. 2007. Protease-activated receptor-induced Akt activation—regulation and possible function. *J Thromb Haemost* 5:2484–2493.
- Schwartz GK, Shah MA. 2005. Targeting the cell cycle: A new approach to cancer therapy. *J Clin Oncol* 23:9408–9421.
- Shaulian E, Karin M. 2001. AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* 20:2390–2400.
- Soh JW, Lee EH, Prywes R, Weinstein IB. 1999. Novel roles of specific isoforms of protein kinase C in activation of the c-fos serum response element. *Mol Cell Biol* 19:1313–1324.
- Strauss O. 2005. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev* 85:845–881.
- Treines I, Paterson HF, Hooper S, Wilson R, Marshall CJ. 1999. Activated MEK stimulates expression of AP-1 components independently of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase) but requires a PI3-kinase signal To stimulate DNA synthesis. *Mol Cell Biol* 19:321–329.
- Trejo J. 2003. Protease-activated receptors: New concepts in regulation of G protein-coupled receptor signaling and trafficking. *J Pharmacol Exp Ther* 307:437–442.
- Villalonga P, Ridley AJ. 2006. Rho GTPases and cell cycle control. *Growth Factors* 24:159–164.
- Weber JD, Raben DM, Phillips PJ, Baldassare JJ. 1997. Sustained activation of extracellular-signal-regulated kinase 1 (ERK1) is required for the continued expression of cyclin D1 in G1 phase. *Biochem J* 326:61–68.
- Xi G, Reiser G, Keep RF. 2003. The role of thrombin and thrombin receptors in ischemic, hemorrhagic and traumatic brain injury: Deleterious or protective? *J Neurochem* 84:3–9.
- Yang K, Hitomi M, Stacey DW. 2006. Variations in cyclin D1 levels through the cell cycle determine the proliferative fate of a cell. *Cell Div* 1:32.
- Yu K, Ma P, Ge J, Willey CD, Yang P, Wang Z, Gao Q. 2007. Expression of protein kinase C isoforms in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 245:993–999.
- Zenz R, Eferl R, Scheinecker C, Redlich K, Smolen J, Schonhaler HB, Kenner L, Tschachler E, Wagner EF. 2008. Activator protein 1 (Fos/Jun) functions in inflammatory bone and skin disease. *Arthritis Res Ther* 10:201.



## Thrombin activation of PI3K/PDK1/Akt signaling promotes cyclin D1 upregulation and RPE cell proliferation

A. Parrales, E. López, A.M. López-Colomé\*

División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-253, Ciudad Universitaria, México, D. F., C.P. 04510, México

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 6 January 2011

Received in revised form 31 May 2011

Accepted 16 June 2011

Available online 23 June 2011

#### Keywords:

Akt  
Thrombin  
Cyclin D1  
Proliferation

### ABSTRACT

The retinal pigment epithelium (RPE) plays an essential role in the survival and function of the neural retina. RPE uncontrolled proliferation leads to the development of proliferative ocular pathologies, among which proliferative vitreoretinopathy (PVR) is the main cause of retinal surgery failure. Upon the breakdown of the BRB due to trauma or metabolic imbalance the contact of RPE with serum-contained thrombin has been shown to stimulate the proliferation of otherwise quiescent RPE cells. Although the molecular mechanisms involved in this effect are still undetermined, thrombin proteolytic activation of protease-activated G protein coupled receptor-1 (PAR-1) activates PI3K and Akt, known to play an essential role in proliferation. The present study demonstrates that: 1) thrombin stimulates Ser 473 Akt phosphorylation without affecting Thr 308 basal phosphorylation in RPE cells; 2) thrombin-induced Akt stimulation promotes cyclin D1 accumulation through the phosphorylation/ inhibition of GSK-3 $\beta$ , thus preventing Thr 286 cyclin D1 phosphorylation, nuclear export and degradation; 3) Akt signaling requires the upstream activation of PI3K and PLC. Since the pharmacological inhibition of these pathways or the silencing of cyclin expression prevent thrombin-induced RPE cell proliferation, these results contribute relevant evidence for establishing the mechanism involved in the development of proliferative eye diseases.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

The retinal pigment epithelium (RPE) is a monolayer of differentiated cells located between the neural retina and the choroidal vasculature which performs essential functions for the survival of retinal neurons and the maintenance of the visual process [1]. Among its functions, RPE contributes to the formation of the blood-retina barrier (BRB), which in addition to maintaining ionic homeostasis at the subretinal space prevents the access of proteins and blood components to the neural retina. Several pathological insults involving the alteration of the BRB expose RPE to serum components [2,3] including thrombin, a serine protease known to play a central role in the coagulation cascade. Thrombin has been shown to participate in a display of cellular responses such as the promotion of growth factor secretion, neural cell survival and apoptosis, cytoskeleton rearrangements and cell proliferation in several cell types [4,5]. Although RPE cells are mitotically inactive under physiological conditions, the contact of RPE with serum-contained thrombin upon the breakdown of the BRB could be involved in the dedifferentiation, proliferation and migration of RPE cells, central phenomena in the pathogenesis of proliferative vitreoretinopathy

(PVR), the major cause of failure in retinal surgery aimed to the correction of retinal detachment or severe ocular trauma [6].

Thrombin exerts its actions by activating a small family of G protein-coupled receptors (GPCRs) named Protease-Activated Receptors (PARs), by the proteolytic cleavage of a specific N-terminal receptor sequence which unmasks a fresh N-terminal that functions as an intramolecular ligand, thus activating PARs and the receptor-coupled G proteins. Four members of the PAR family have been described: PAR-1, PAR-3, and PAR-4, activated by thrombin, and PAR-2 activated by trypsin, tryptase, and other trypsin-like proteases. PAR-1, the prototype of this family, signals through G<sub>q11 $\alpha$</sub> , G<sub>12/13 $\alpha$</sub> , and G<sub>i $\alpha$</sub>  G proteins, which accounts for the pleiotropic action of its ligands [7]. PAR-mediated activation of G<sub>q</sub> induces an increase in intracellular inositol-trisphosphate (IP<sub>3</sub>) and calcium, and the downstream activation of protein kinase C (PKC), phosphoinositide-3 kinase (PI3K), and mitogen-activated protein kinases (MAPKs). The activation of PARs is also coupled to the inhibition of adenylyl cyclase via G<sub>i $\alpha$</sub>  G proteins and, more recently, PAR-1 coupling to G<sub>12/13</sub> activation was identified, although the downstream modulation of G<sub>12/13</sub> effectors such as Rho GTPase and guanine nucleotide exchange factors (GEFs) by PAR-1 stimulation remains largely undefined [8].

PAR-1 stimulation has been shown to promote intracellular signaling through the activation of the MAPK ERK1/2, PKC and PI3K cascades which are involved in the regulation of the cell cycle regulator cyclin D1 [9]. Particularly, thrombin activation of PI3K family of lipid kinases through a G <sub>$\beta\gamma$</sub>  subunit-dependent mechanism [10] results in

\* Corresponding author. Tel.: +52 55 5622 5617; fax: +52 55 5622 5607.  
E-mail address: [acolome@ifc.unam.mx](mailto:acolome@ifc.unam.mx) (A.M. López-Colomé).

the activation of phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK1) and the downstream stimulation of Protein Kinase B (Akt/PKB), known to be involved in the development of proliferative diseases [11,12].

Based on their specificity, structure and regulation, PI3Ks are grouped in three classes [13]. Class I PI3Ks are heterodimeric enzymes which generate phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PIP<sub>3</sub>) from phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PI-4,5-P<sub>2</sub>), whereas the monomeric PI3Ks in class II generate phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate (PI-3,4-P<sub>2</sub>) and those in class III generate PI-3,4-P<sub>2</sub> and PIP<sub>3</sub> *in vivo*. The class I PI3K family includes two subfamilies: class IA, activated by receptor tyrosine kinases (RTKs), and class IB, activated by GPCR-dependent signaling [14].

Distinct growth factors and hormones induce the translocation of PI3K catalytic subunit to the plasma membrane [15] where the phosphorylation of membrane phosphatidylinositol at the C3-OH position of the inositol ring is known to anchor proteins containing plekstrin homology (PH) domains such as Akt/PKB and PDK1. The full activation of Akt requires the phosphorylation of Thr 308, located in the activation loop, and of Ser 473, located in the C-terminal region [15]. While PDK1 has been shown to phosphorylate Thr 308, the kinase responsible for Akt Ser 473 phosphorylation remains undetermined, although rapamycin-insensitive complex of mammalian target of rapamycin (mTORC2) seems to be a viable candidate [16–18].

Akt, the main effector of PI3Ks, regulates cell proliferation through distinct mechanisms that involve the activation of MAPK, GSK-3 $\beta$ , p70 S6K signaling cascades; the activation of transcription factors such as NF $\kappa$ B, Forkhead and AP-1; and the control of translation by mTORC1 [15,19,20]. Importantly, the PI3K/PDK1/Akt pathway is up-regulated in proliferative diseases, including cancer [14].

Thrombin has been shown to induce the expression of cyclin D1 in cortical neurons [21] as well as the proliferation of brain astrocytes and retinal glia [4,5]. Particularly in RPE cells, the activation of PAR-1 by thrombin promotes cell cycle progression and proliferation by increasing c-Fos and cyclin D1 expression, mediated by PI3K/ERK1/2 and PLC- $\beta$ /PKC signaling [22,23]. Also on this line, studies in human RPE cells have demonstrated that the inhibition of cyclin D1 expression significantly prevents serum-induced proliferation [24]. Based on these data, a role for thrombin in the pathogenesis of proliferative eye disorders such as PVR may be considered.

Our previous work demonstrated that thrombin stimulation increases cyclin D1 gene expression and proliferation of RPE cells [23]. In addition to gene expression, cyclin D1 concentration is under the control of molecular mechanisms which regulate cyclin degradation [9,20,25]. Among these, glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) is known to repress cell cycle progression by directly phosphorylating cyclin D1 [19] and indirectly regulating cyclin D1 transcription by inhibiting Wnt signalling. Cyclin D1 phosphorylation at Thr 286, promotes cyclin nuclear-cytoplasmic translocation and rapid degradation [26,27].

To further investigate the molecular mechanism responsible for thrombin-induced RPE cell proliferation, in the present study we analyzed the role of PI3K/PDK1/Akt/GSK-3 $\beta$  signaling in thrombin promotion of cyclin D1 expression and RPE cell proliferation. Our results demonstrate for the first time that thrombin induces the progression of cell cycle, and the proliferation of RPE cells through the activation of Akt and the downstream inactivation of GSK-3 $\beta$  which in turn, leads to cyclin D1 stabilization and accumulation.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Reagents

All reagents used were cell culture grade. Thrombin, hirudin, AG-1478 and Ro-32-0432 were obtained from Calbiochem (San Diego, CA, USA); AG-1296, wortmannin, trifluoperazine and Akt inhibitor were from Sigma (St. Louis MO, USA); PPACK was from Enzo Life Science (Farmingdale, NY, USA) OSU was from Echelon biosciences (Salt Lake

City, UT, USA); LY294002, U-73122 and KN62 were from Tocris (Ellisville, MO, USA). Serum-free Opti-MEM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was used as the standard medium for all assays.

The monoclonal antibodies rabbit anti-Akt, rabbit anti-phospho Akt Ser 473, rabbit anti-GSK-3 $\beta$  and rabbit anti-phospho GSK-3 $\beta$  Ser 9 were obtained from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). Rabbit anti-phospho Akt Thr 308, mouse anti-cyclin D1, mouse anti-actin and mouse anti-GAPDH were purchased from Santacruz Biolabs (Santacruz, CA, USA). Secondary HRP-conjugated anti-rabbit IgG and HRP-conjugated anti-mouse IgG antibodies were from Zymed Laboratories (San Francisco, CA, USA).

### 2.2. Cell culture

RPE cells were isolated from 8- to 10-day-old Long Evans rat, as previously described [28]. Briefly, the eyes were enucleated, rinsed in Dulbecco modified Eagle medium (DMEM) containing 0.0125% penicillin and streptomycin, 0.025% neomycin, and 0.01% nystatin (Gibco BRL), and incubated in DMEM containing 2% dispase for 30 min at 37 °C. After removal of the sclera, RPE was detached in calcium- and magnesium-free Hanks' balanced salt solution (HBSS), incubated in the presence of 0.1% trypsin-EDTA (Gibco) for 2 min, and mechanically dissociated using a Pasteur pipette. Trypsin digestion was stopped by 4% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL). Cells were separated by centrifugation, suspended in Opti-MEM plus 4% FBS, and seeded in six-well plates at  $3 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> density. After 4 days in culture, cells were serum-deprived for 48 h prior to stimulation with thrombin (0–4 U/ml), in order to synchronize the cells. The effect of serum deprivation on RPE cell viability was assessed by trypan blue exclusion. Cell viability in serum-deprived vs. control cultures in serum-containing medium was  $\geq 90\%$ . All experiments were performed in synchronized cultures.

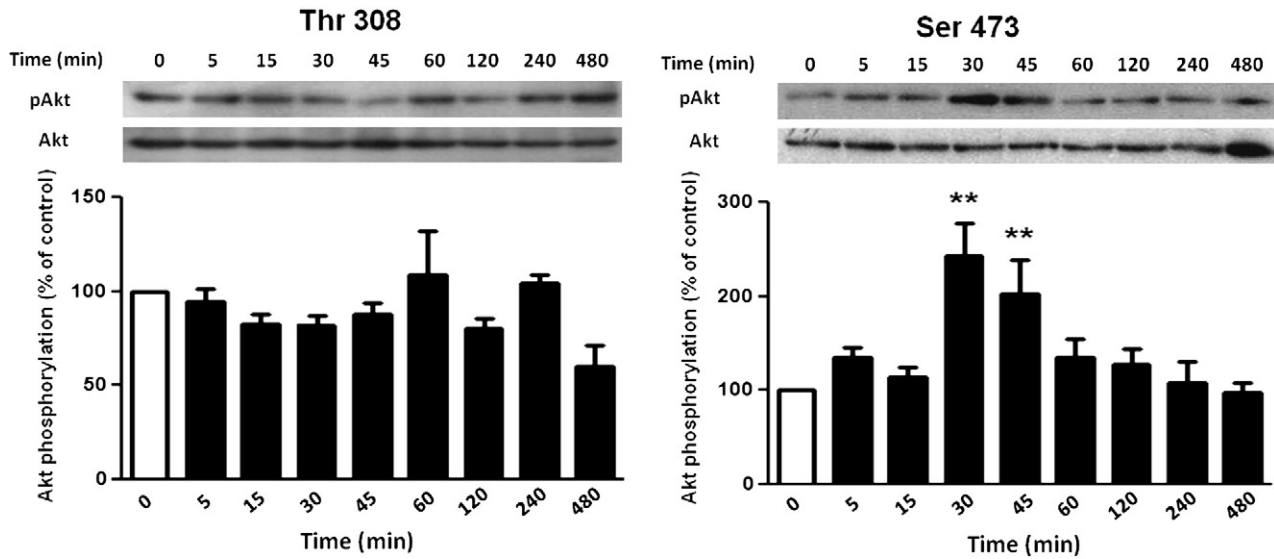
### 2.3. RPE cell proliferation

RPE cell proliferation was determined by [<sup>3</sup>H] thymidine incorporation and the colorimetric MTS [(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl) -2H- tetrazolium] reduction method in non-confluent cultures, as previously described [22,23]. Cells were incubated for 24 h with 0.2  $\mu$ Ci/ml [<sup>3</sup>H] thymidine (PerkinElmer; 16 Ci/mmol) in the absence (control) or presence of thrombin. After washing in PBS, cultures were added trichloroacetic acid (10%) for 1 h, solubilized in 0.5% sodium dodecyl sulfate (SDS), and counted for radioactivity in a liquid scintillation counter (Beckman). Proliferation was also assessed by MTS reduction method (Cell Titer 96<sup>®</sup> Aqueous One Solution Reagent, Promega) following the manufacturer's instructions. Absorbance at 490/630 nm was corrected for background, and the optical density (OD) from non-stimulated cultures was arbitrarily set as 100% (basal) proliferation. When tested, inhibitors were added 1 h prior to thrombin stimulation.

### 2.4. Western blot analysis

Cells were disrupted in lysis buffer containing 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, 40 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 10 mM sodium pyrophosphate, and 10% of a protease inhibitor cocktail (SIGMA).

Protein in the lysates was quantified using the Bradford method and 20  $\mu$ g of the total protein was used for protein immunodetection analysis. The lysates were solubilized in Laemmli buffer (0.75 mM Tris-HCl; pH 8.8, 5% SDS, 20% glycerol and 0.01% bromophenol blue), boiled for 5 min, resolved by SDS/PAGE (12.5%), and transferred onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Amersham Biosciences). After blocking for 1 h at room temperature with 5% non-fat milk in Tween TBS, the PVDF membranes were probed with primary antibodies against Akt (1:1000), phospho Akt Ser 473 (1:1000), phospho Akt Thr



**Fig. 1.** Thrombin stimulates Ser 473 Akt phosphorylation. Cells were cultured as described in [Materials and methods](#) and stimulated with 4 U/ml thrombin. Relative Akt phosphorylation was determined by Western blot. Thrombin induced the time-dependent phosphorylation of Akt on Ser 473. Thr 308 Akt phosphorylation level was unaffected by thrombin treatment. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \*\*  $P < 0.01$ , Student's *t*-test, compared to control.

308 (1:500), GSK-3 $\beta$  (1:1000), phospho GSK-3 $\beta$  Ser 9 or cyclin D1 (1:3000) at 4 °C for 24 h. Secondary HRP-conjugated antibody (1:5000) was included for 1 h and membranes were developed using the Immobilon Western AP Chemiluminescent Substrate (Millipore, Billerica, MA, USA). Kodak® film images were digitized using an Alpha Digi-Doc system (Alpha-Innotech, San Leandro, CA, USA), and densitometric analysis was performed using the Quantity One Software v4.6 from BioRad (Hercules, CA, USA) and normalized to control values. GAPDH immunodetection was used as loading control.

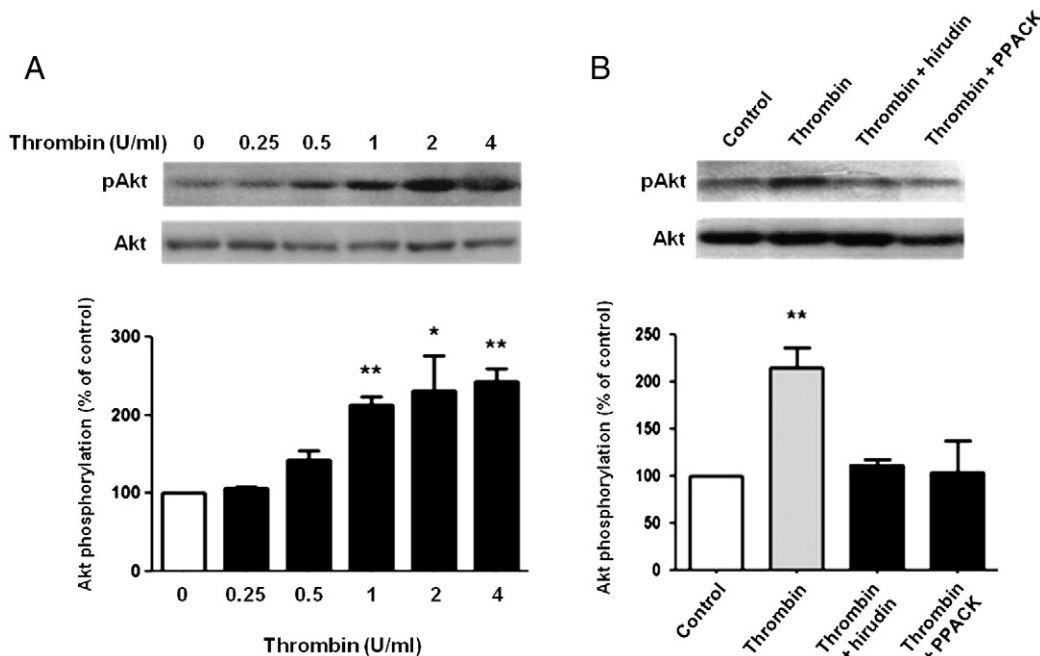
### 2.5. Cyclin D1 silencing

Cyclin D1 small interfering RNA (siRNA) was purchased from Sigma (SASI\_Rn02\_00269089). The effect of cyclin D1 knockdown

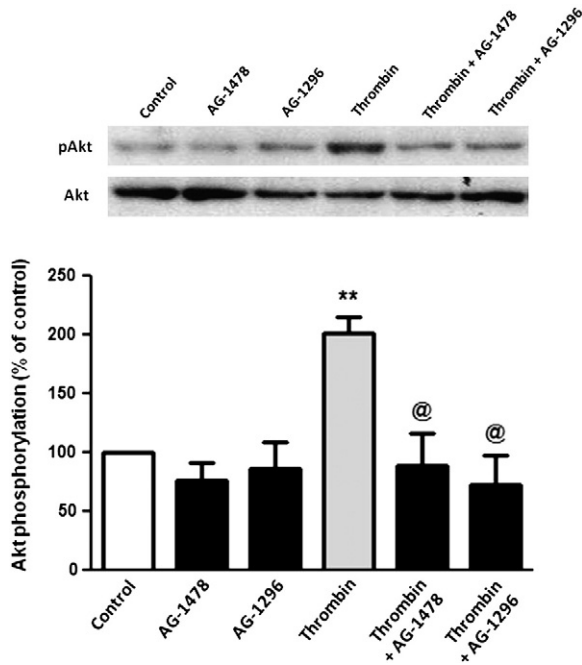
on RPE cell proliferation was tested in 30–50% confluent cultures. Transfection of siRNA was performed using Lipofectamine RNAi-MAX reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in antibiotic-free 4% FBS-supplemented Opti-MEM medium for 48 h. Following transfection, cell proliferation was assessed by the MTS reduction method. Cyclin D1 silencing was determined by western blot. Lipofectamine-treated and non-treated cells were used as controls.

### 2.6. Statistical analysis

Raw data for analysis were obtained from pooled RPE cells of 10–15 Long Evans Rats in three independent experiments. Unpaired Student *t*-test was applied for statistical analysis, using the Prism



**Fig. 2.** Thrombin induces the specific, dose-dependent phosphorylation of Akt on Ser 473. RPE cells were exposed to 4 U/ml thrombin for 30 min. A. Thrombin induced Ser 473 Akt phosphorylation in a dose-dependent manner. B. Inactivation of thrombin by hirudin (8 U/ml) or by the catalytic blocker PPACK (25  $\mu$ M) prevents thrombin-induced Ser 473 Akt phosphorylation. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , Student's *t*-test, compared to control.



**Fig. 3.** Thrombin-induced Ser 473 Akt phosphorylation involves the activation of EGF and PDGF receptors. Cells were stimulated with thrombin (4 U/ml) in presence or absence of specific inhibitors for EGF (AG-1478, 10  $\mu$ M) and PDGF (AG-1296, 10  $\mu$ M) receptor activity. The inhibition of EGF and PDGF receptors prevented thrombin-induced Ser 473 Akt phosphorylation. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \*\*  $P < 0.01$ , Student's *t*-test, referred to control. @  $P < 0.05$ , Student's *t*-test, referred thrombin-stimulated cells.

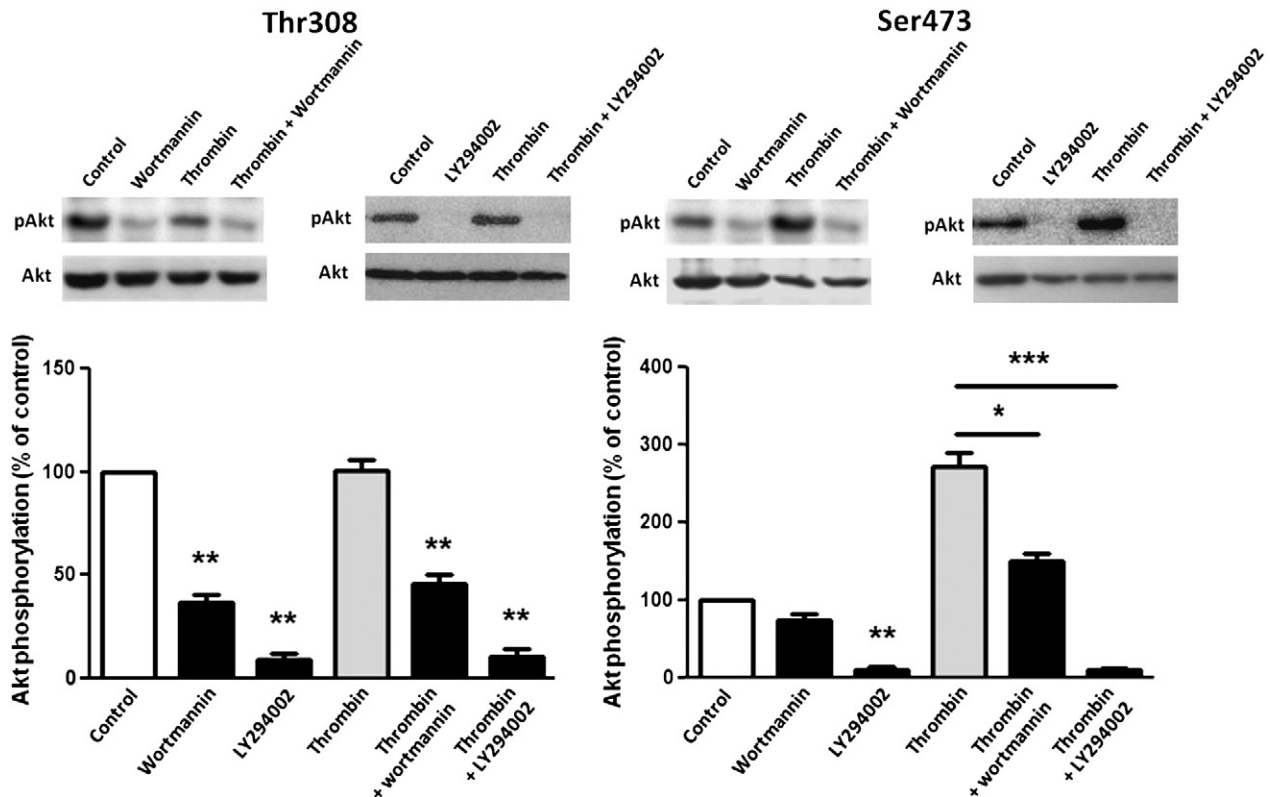
V4.0 program from Graph Pad. Statistical significance was determined using Student's *t*-test.

### 3. Results

#### 3.1. Thrombin increases Akt phosphorylation/activation in RPE cells

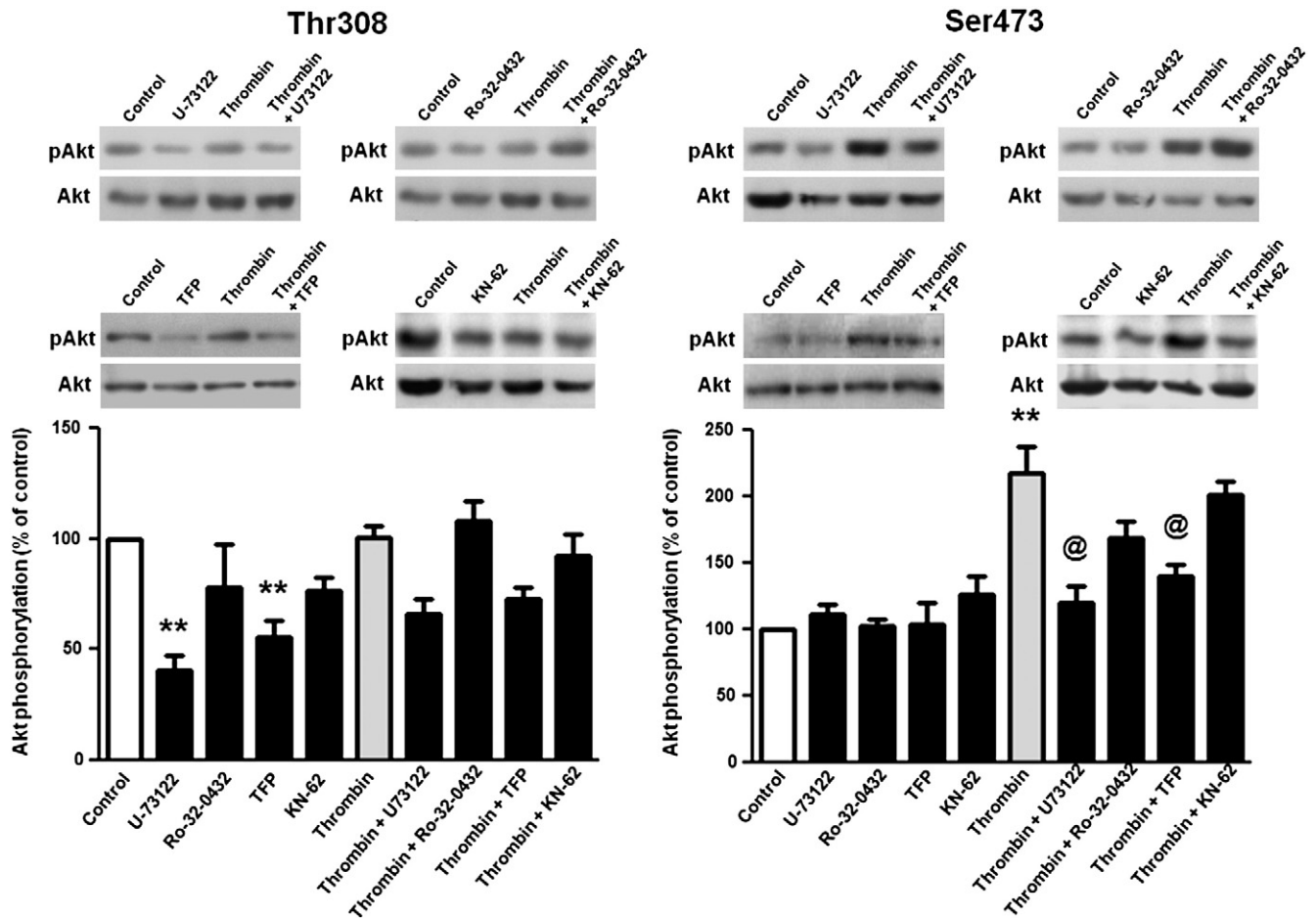
The effect of thrombin on the phosphorylation of Akt at Thr 308 and Ser 473 was analyzed. As depicted in Fig. 1, exposure of cultured cells to 2 U/ml thrombin results in a significant increase in Ser 473 Akt phosphorylation, reaching a plateau from 30 to 45 min and gradually decreasing thereafter. In contrast, the phosphorylation level of Akt Thr 308 was not modified by this treatment (Fig. 1). Exposure of RPE cells to increasing concentrations of thrombin revealed a clear dose-dependence of Ser 473 Akt phosphorylation (Fig. 2A), indicating the specificity of the effect. This result was further confirmed by the inhibition of this effect by the inactivation of thrombin by its natural inhibitor hirudin, or by the catalytic inhibitor PPACK prior to addition to the cultures (Fig. 2B). These results demonstrate that thrombin stimulates the phosphorylation of Akt at Ser 473 in a specific, dose-dependent manner, without modifying Thr 308 basal level of phosphorylation.

Thrombin has been shown to promote the transactivation of growth factor receptors in RPE cells [29]. In order to establish whether thrombin-induced Akt activation depends on VEGF and PDGF receptor transactivation, we tested the effect of specific receptor inhibitors on thrombin-induced Ser 473 Akt phosphorylation. Our results showed that Akt phosphorylation requires VEGF and PDGF receptor activation (Fig. 3).



**Fig. 4.** Thrombin-induced Akt activation requires PI3K activity. Cells were exposed to 4 U/ml thrombin in the absence (control) or presence of the specific PI3K inhibitors wortmannin (100 nM) and LY294002 (10  $\mu$ M). The inhibition of PI3K prevented thrombin-induced Akt phosphorylation. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  Student's *t*-test, compared to control.





**Fig. 5.** Akt activation by thrombin is unrelated to c/n PKC isoforms and CaMKII. RPE cells were stimulated with 4 U/ml thrombin, and Thr 308 and Ser 473 Akt phosphorylation was assessed in the absence (control) or presence of specific enzyme inhibitors: U-73122 for PLC (2.5 nM); Ro-32-0432 for c/nPKC (20  $\mu$ M), for calmodulin (trifluoperazine [TFP] 50  $\mu$ M) and for CaMKII (KN-62, 5  $\mu$ M). The inhibition of PLC and calmodulin significantly decreased the basal level of Thr 308 and Ser473 Akt phosphorylation, as well as thrombin-stimulated Ser473 phosphorylation. Inhibition of c/nPKC and CaMKII had no effect on Akt phosphorylation. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \*\*  $P < 0.01$ , Student's *t*-test, compared to control. @  $P < 0.01$ , Student's *t*-test, compared to thrombin-stimulated cells.

### 3.2. Thrombin-induced Akt activation requires PI3K, PLC and calcium/calmodulin signaling

The phosphorylation of Akt at Ser 473 has been suggested to require the prior phosphorylation of Thr 308 by PI3K/PDK1 [15,17]. Since thrombin did not modify Thr 308 phosphorylation, we asked if PI3K-dependent maintenance of basal Thr 308 phosphorylation is required for the further phosphorylation of Ser 473. To this end, we tested the effect of the PI3K inhibitors wortmannin and LY294002 on Akt phosphorylation. Results in Fig. 4 show that wortmannin reduced the basal phosphorylation of Thr 308 by 55.4%, and also inhibited, by 70.1%, thrombin-induced Akt phosphorylation at Ser 473. The addition of LY294002 abolished both, the basal phosphorylation of Thr 308 and thrombin-induced Akt phosphorylation at Ser 473 (Fig. 4), indicating that induction of Ser 473 phosphorylation requires Thr 308 phosphorylated Akt.

Calcium/calmodulin-dependent kinases, PKC and PLC have been implicated in thrombin-induced signaling to Akt [17]. The possible contribution of these pathways to thrombin-induced Akt phosphorylation was tested by the pharmacologic inhibition of calmodulin by trifluoperazine (50  $\mu$ M), of CaMKII by KN-62 (5  $\mu$ M), of c/nPKC by Ro-32-0432 (20  $\mu$ M), and of PLC by U-73122 (2.5 nM). Results showed that CaMKII and c/nPKC isoforms are not involved in thrombin-induced Akt phosphorylation; in contrast, the inhibition of PLC or calmodulin prevented thrombin-induced Ser 473 Akt phosphoryla-

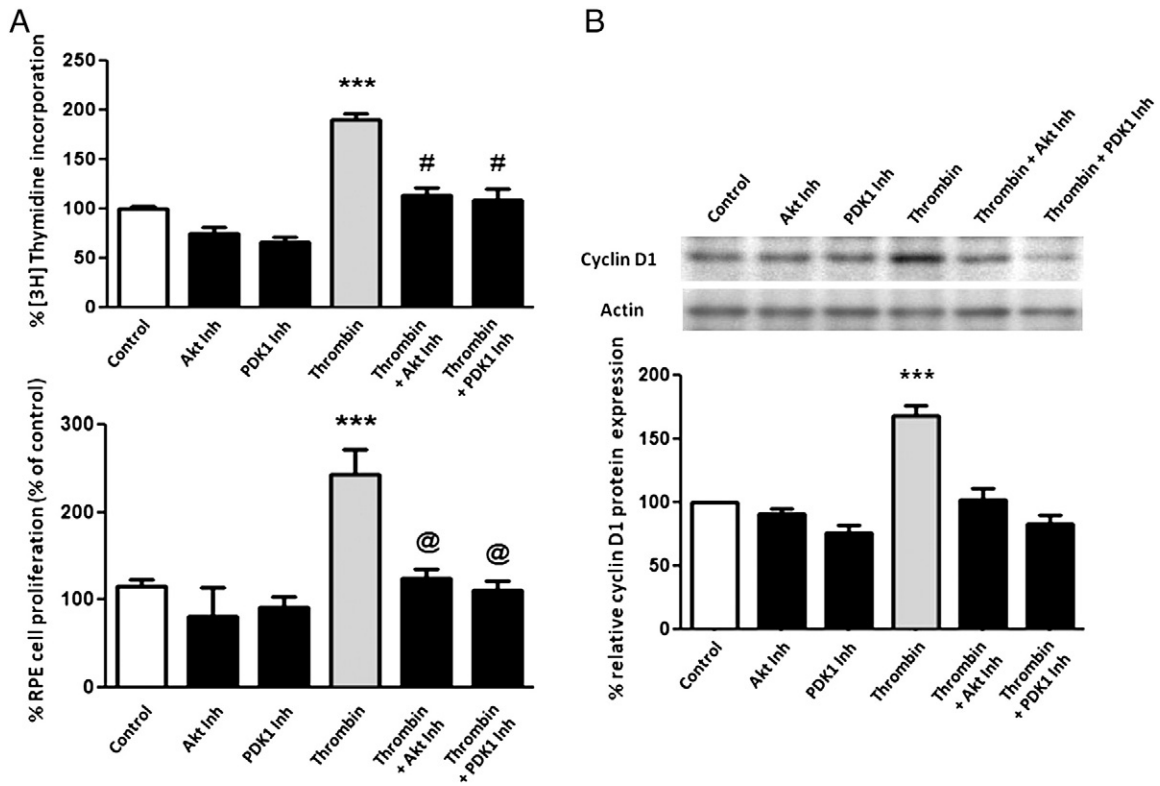
tion by 74.9% and 66.5%, respectively (Fig. 5B). Furthermore, the inhibition of PLC or calmodulin significantly decreased the basal level of Thr 308 phosphorylated Akt (Fig. 5A). Together, these results indicate the participation of PI3K, PLC and calcium/calmodulin signaling in thrombin-induced Akt activation.

### 3.3. Thrombin-induced RPE cell proliferation requires Akt activation

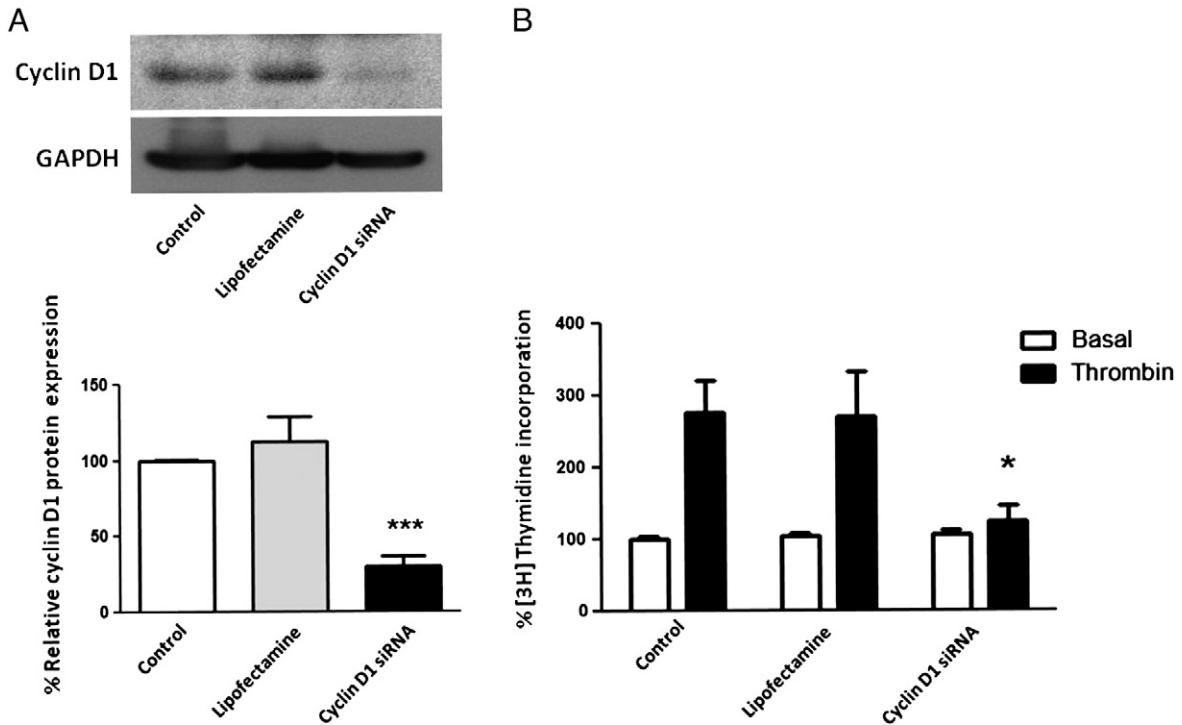
Our previous work showed that thrombin promotes RPE cell proliferation [22,23]. To investigate if PI3K/PDK1/Akt signaling is involved in the control of proliferation, we tested the effect of Akt and PDK1 specific inhibition on [ $^3$ H]-thymidine incorporation and MTS reduction in thrombin-stimulated cells. Our results demonstrate that the inhibition of Akt or PDK1 prevents thrombin-induced [ $^3$ H]-thymidine incorporation and MTS reduction, hence indicating the inhibition of cell proliferation (Fig. 6A). These results suggest that thrombin-induced proliferation requires PDK1/Akt activation in RPE cells.

### 3.4. Akt mediates thrombin-induced cyclin D1 accumulation

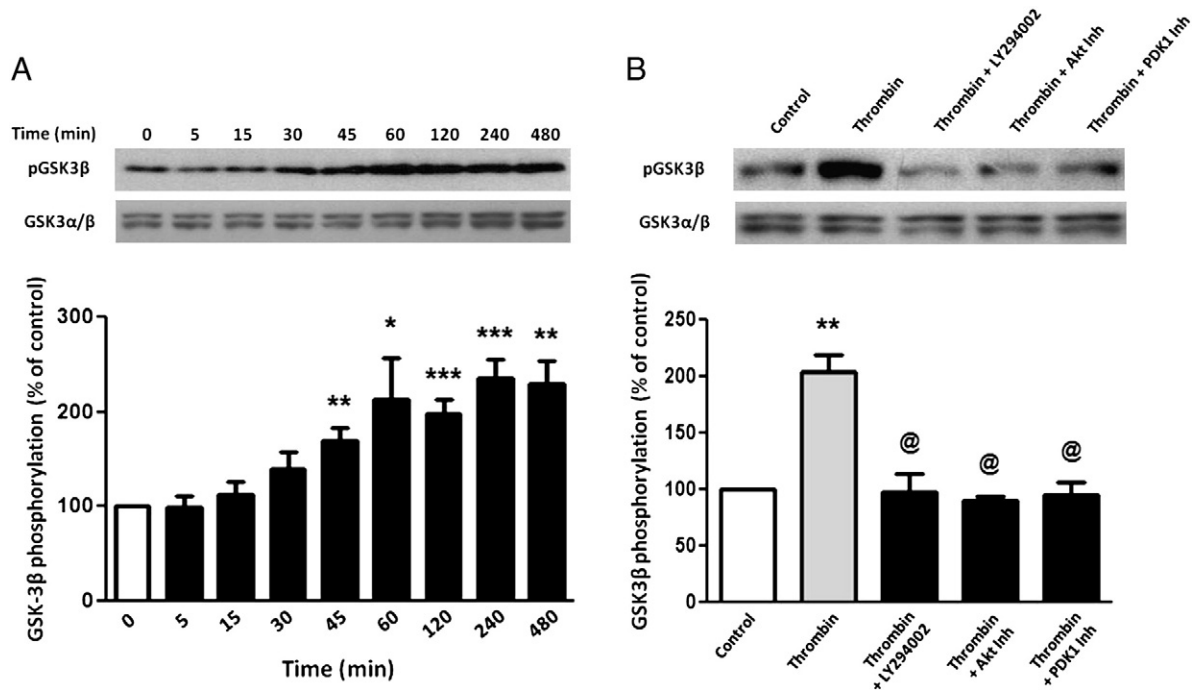
The stimulation of cyclin D1 expression by thrombin in RPE cells has been reported [23]. In order to establish if cyclin D1 accumulation depends on PDK1/Akt activity, we analyzed the effect of Akt and PDK1 inhibitors on thrombin-induced cyclin D1 increase. Our results



**Fig. 6.** Induction of RPE cell proliferation by thrombin requires Akt-mediated cyclin D1 accumulation. Cells were stimulated with 4 U/ml thrombin in the presence or absence of Akt inhibitor (500 nM) or the PDK1 inhibitor OSU-03-012 (5 μM). **A.** Proliferation was measured by [3H]-thymidine incorporation (top) or MTT assay (bottom). Inhibition of Akt or PDK1 prevented thrombin-induced RPE cell proliferation. **B.** Cyclin D1 concentration was determined by western blot. Inhibition of Akt or PDK1 prevented cyclin D1 expression. Results are expressed as the mean ± SEM of three independent experiments. \*\*\* P<0.001, Student's *t*-test, compared to control. @ P<0.01, # P<0.001 Student's *t*-test, relative to thrombin-stimulated cells.



**Fig. 7.** RPE cell proliferation requires cyclin D1 expression. **A.** RPE cells were transfected with cyclin D1 siRNA, and cyclin D1 level was determined after 72 h by western blot. Proliferation was measured following 24 h thrombin treatment. Cyclin D1 siRNA decreased thrombin-stimulated cyclin D1 protein expression by 70%. **B.** Thrombin-induced RPE cell proliferation measured by [3H]-thymidine incorporation, was prevented by silencing cyclin D1 expression. Non-transfected and lipofectamine-treated cells were used as controls. Results are expressed as the mean ± SEM of two independent experiments. \* P<0.05, \*\*\* P<0.001 Student's *t*-test, compared to control.



**Fig. 8.** Activation of Akt by thrombin induces GSK3 $\beta$  phosphorylation. RPE cells were stimulated with 4 U/ml thrombin in the absence or presence of specific inhibitors for Akt (500 nM) and PDK1 (OSU-03-012, 5  $\mu$ M). Ser 9 GSK3 $\beta$  phosphorylation was determined by Western blot. A. Thrombin induced GSK3 $\beta$  phosphorylation from 45 min up to 480 min stimulation. B. The Akt inhibitor (500 nM) and the PDK1 inhibitor OSU-03-012 (5  $\mu$ M) prevented thrombin-induced GSK3 $\beta$  phosphorylation/inactivation in RPE cells. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM of three experiments. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  Student's *t*-test, referred to control. @  $P < 0.01$ , Student's *t*-test, referred thrombin-stimulated cells.

showed that the inhibition of PDK1/Akt signaling abolished cyclin D1 increase induced by thrombin (Fig. 6B), suggesting that this signaling pathway is responsible for RPE proliferation. In order to confirm this assumption, we asked if thrombin-induced proliferation requires cyclin D1 gene expression, by silencing cyclin D1 expression using specific siRNA. Results depicted in Fig. 6A demonstrate that cyclin D1 silencing by siRNA transfection decreases cyclin D1 protein expression by 70%. Furthermore, an 86.5% decrease in thrombin-induced RPE cell proliferation was observed upon cyclin D1 expression silencing (Fig. 7B). These data demonstrate that thrombin stimulates cell proliferation by promoting cyclin D1 gene expression.

### 3.5. Thrombin induces Akt-dependent GSK-3 $\beta$ phosphorylation

In addition to gene expression, Akt signaling may increase cyclin D1 concentration by distinct molecular mechanisms, including stabilization [9,20,25]. Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) represses cell cycle progression by directly phosphorylating cyclin D1 [19] at Thr 286, which promotes its degradation. In order to explore if thrombin stimulates cyclin D1 accumulation by inactivating GSK-3 $\beta$ , we examined the inactivation of this enzyme by phosphorylation at Ser 9. As shown in Fig. 8A increased GSK-3 $\beta$  phosphorylation at Ser 9 was observed following 45 min in the presence of thrombin, which was sustained up to 480 min. This effect was prevented by the inhibition of PI3K, PDK1 or Akt (Fig. 8B), suggesting that thrombin activation of Akt inactivates GSK-3 $\beta$ , hence promoting the stabilization of cyclin D1.

## 4. Discussion

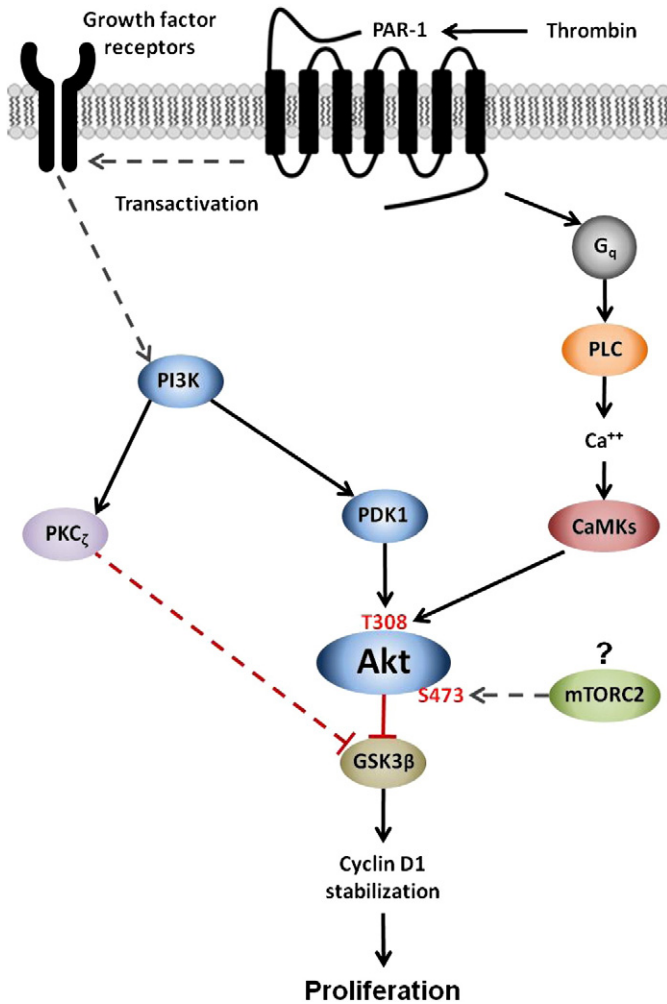
Upon the alteration of the BRB, the interaction of RPE cells with thrombin contained in blood serum is an important determinant in the development of proliferative eye disorders generated by the

epithelial-mesenchymal transition, proliferation and migration of RPE cells, and the formation of epiretinal membranes which impair vision. In fact, intraocular hemorrhage during or after surgery is among the most important clinical risk factors for the development of proliferative vitreoretinopathy [30], the major cause of retinal surgery failure [6]. Although the molecular mechanisms leading to this outcome have not been established, the activation of Akt/PKB signaling is a key event in thrombin-induced proliferation of several cell types [31–33]. The present work was aimed to determine whether Akt activation is required for thrombin-induced cyclin D1 expression and proliferation in RPE cells.

Our present study demonstrates that, in contrast with findings showing that thrombin induces Akt phosphorylation at both Thr 308 and Ser 473 in different cell types [17], this mechanism differs in RPE cells. Whereas the phosphorylation level of Akt at Thr 308 remains unaltered by thrombin treatment (Fig. 1), Ser 473 phosphorylation was increased in a specific and dose-dependent manner (Fig. 2), indicating that Ser 473 phosphorylation is the regulatory event in thrombin-induced Akt activation in RPE cells.

Our results showed that thrombin stimulation of Ser 473 Akt phosphorylation required 30 min thrombin exposure, which differs from the fast phosphorylation of Akt observed in response to tyrosine kinase receptor activation [34,35], suggesting that an indirect mechanism could mediate PAR-1 signaling to Akt. Based on recent evidence showing that thrombin induces VEGF secretion in RPE cells through PAR-1 transactivation of PDGF receptor [29], we tested the effect of VEGF and PDGF receptor inhibition, and showed that thrombin stimulates Akt phosphorylation through the transactivation of growth factor receptors, which explains the delayed response of Akt to thrombin (Fig. 3).

PI3K, CaMK and PKC signaling pathways have been implicated in the regulation of Akt activity [17]. On this matter, thrombin promotion of PI3K signaling through PAR-coupled G  $\beta\gamma$  subunits



**Fig. 9.** Schematic representation of RPE cell proliferation stimulated by thrombin. The activation of PAR1 stimulates Akt through the parallel activity of PI3K/PDK1 on Thr 308 and that of PLC/CaMKs on Ser 473. While Akt phosphorylates/inactivates GSK3 $\beta$ , the sustained inhibition of this enzyme, which prevents cyclin D1 degradation, is conceivably maintained by PKC $\zeta$ . The increased stability of cyclin D1 prevents nuclear export thus allowing cell cycle progression and proliferation.

has been reported [36]. Furthermore, the induction of NF- $\kappa$ B transcriptional activity in endothelial cells by thrombin is achieved by the parallel engagement of G $\alpha_q$ /PKC and G $\beta\gamma$ /PI3K signaling pathways that converge at Akt [33]. We analyzed the possible contribution of these pathways to thrombin-induced Akt activation in RPE cells. As expected, the inhibition of PI3K by wortmannin or LY294002 reduced Akt basal phosphorylation at Thr 308. Surprisingly, thrombin stimulation of Ser 473 Akt phosphorylation was prevented by PI3K inhibition (Fig. 4), indicating that phosphorylated-Thr 308 is required for Ser 473 phosphorylation, in agreement with recent data obtained in cancer cells [15]. Additionally, the inhibition of Ser 473 Akt phosphorylation by the inhibition of PI3K could relate to the decreased formation of PIP3, required for Akt recruitment to the plasma membrane, prior to activation [37].

Thrombin has been shown to activate PLC in RPE cells [22]. Since the PLC products, DAG and IP3 (Ca<sup>2+</sup>) are known to stimulate c/nPKCs, and the calcium/calmodulin-dependent kinases (CaMKs) respectively, we analyzed the contribution of these pathways to the stimulation of Akt phosphorylation. Our results demonstrate that whereas PLC inhibition prevented thrombin-induced Ser 473 Akt phosphorylation, the inhibition of c/nPKC, had no effect (Fig. 5). Although the participation of the novel PKC $\delta$  and PKC $\theta$ , which are

not inhibited by Ro-32-0432 [38] cannot be ruled-out, PLC signaling to Akt seems to involve signals different from DAG-sensitive c/ $\epsilon$ PKC isoforms (Fig. 5).

Among the CaMKs activated by PLC-derived calcium increase, CaMKII has been implicated in Akt activation [39]. We showed that, although CaMKII does not seem to be involved in thrombin-induced Akt phosphorylation, the inhibition of calmodulin did prevent thrombin-induced Ser 473 Akt phosphorylation and also decreased basal Thr 308 phosphorylation level (Fig. 5), which demonstrates that PLC-dependent activation of a calcium/calmodulin kinase, distinct from CaMKII is required for thrombin effect on Akt activation in RPE cells. On this matter, recent evidence has shown that Akt is a downstream target for CaMKIII, also known as eukaryotic elongation factor-2 (eEF-2) kinase [40], and hence, could be implicated in PLC-induced Akt phosphorylation observed.

Previous studies from our group demonstrated that thrombin-induced RPE cell proliferation requires cyclin D1 accumulation [23]. We here showed that the inhibition of PDK1 or Akt prevented thrombin-induced cyclin D1 accumulation (Fig. 6B). Moreover, siRNA silencing of cyclin D1 expression prevented proliferation (Fig. 7), confirming that thrombin stimulates proliferation by Akt-dependent increase in cyclin D1 protein expression. On this line, the inhibition of DNA synthesis and cell division upon PDK1 and Akt inhibition we observed (Fig. 6A) are in agreement with previous reports suggesting that PDK1/Akt signaling is essential for thrombin-induced RPE cell proliferation [31,41].

In addition to transcriptional control, Akt may contribute to cyclin D1 nuclear accumulation through the phosphorylation of GSK-3 $\beta$  on Ser9, which inactivates this enzyme, preventing cyclin degradation [9,19]. We showed that the stimulation of Akt by thrombin induces the phosphorylation of GSK-3 $\beta$  (Fig. 8A, B). Together, these results suggest that the activation of Akt increases cyclin D1 concentration by two mechanisms: promotion of gene expression and stabilization of the translated protein.

Although the mechanism by which the transient activation of Akt Ser 473 (30 to 45 min) induces the sustained phosphorylation of GSK-3 $\beta$  on Ser 9 up to 480 min stimulation requires further investigation, our results suggest that while Akt is responsible for GSK-3 $\beta$  phosphorylation, the phosphorylated state is maintained through a distinct molecular mechanism. Among the kinases capable of regulating GSK-3 $\beta$  function, the atypical PKC $\zeta$  isoform has recently been shown to phosphorylate GSK-3 $\beta$  at Ser 9 [42]. Since we have shown previously that thrombin-induced cyclin D1 protein expression (unpublished) and RPE cell proliferation require PKC $\zeta$  activity [23], it is tempting to speculate that Akt transient activation induces GSK-3 $\beta$  phosphorylation, whereas the long lasting activation of PKC $\zeta$  by thrombin could be responsible for sustained phosphorylation of GSK-3 $\beta$  and the consequent stabilization of cyclin D1 (Fig. 9).

The activation of Akt/PKB signaling is a key event in thrombin-induced proliferation of several cell types [4,10,31,32]. Furthermore, this pathway is up-regulated in proliferative pathologies such as cancer [15,43]. Since proliferation is a key phenomenon in the development of proliferative eye diseases, our work contributes information for the development of strategies aimed to the prevention and treatment of proliferative eye pathologies, which are a major cause of blindness.

#### Acknowledgements

This work was partially supported by grants CB-80398 from CONACyT and IN-200209 from PAPIIT/UNAM to A. M. L. C. This study is part of the requirements for the PhD degree in Biomedical Sciences of Alejandro Parrales Briones at the Universidad Nacional Autónoma de México and was supported by a CONACyT fellowship. The authors thank Dr. Jose Prisco Palma-Nicolas for collaboration.

## References

- [1] O. Strauss, The retinal pigment epithelium in visual function, *Physiol. Rev.* 85 (2005) 845–881.
- [2] M. Mund, M. Rodrigues, The retinal pigment epithelium, in: K. Zinn, M. Marmor (Eds.), *The Retinal Pigment Epithelium*, Harvard University Press, London, 2006, pp. 45–52.
- [3] H. Nagasaki, K. Shinagawa, M. Mochizuki, Risk factors for proliferative vitreoretinopathy, *Prog. Retin. Eye Res.* 17 (1998) 77–98.
- [4] O. Nicole, A. Goldshmidt, C.E. Hamill, S.D. Sorensen, A. Sastre, P. Lyuboslavsky, J.R. Hepler, R.J. McKeon, S.F. Traynelis, Activation of protease-activated receptor-1 triggers astrogliosis after brain injury, *J. Neurosci.* 25 (2005) 4319–4329.
- [5] D.G. Puro, T. Mano, C.C. Chan, M. Fukuda, H. Shimada, Thrombin stimulates the proliferation of human retinal glial cells, *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 228 (1990) 169–173.
- [6] J.C. Pastor, E.R. de la Rúa, F. Martin, Proliferative vitreoretinopathy: risk factors and pathobiology, *Prog. Retin. Eye Res.* 21 (2002) 127–144.
- [7] J. Trejo, Protease-activated receptors: new concepts in regulation of G protein-coupled receptor signaling and trafficking, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 307 (2003) 437–442.
- [8] S.R. Macfarlane, M.J. Seatter, T. Kanke, G.D. Hunter, R. Plevin, Proteinase-activated receptors, *Pharmacol. Rev.* 53 (2001) 245–282.
- [9] J. Liang, J.M. Slingerland, Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression, *Cell Cycle* 2 (2003) 339–345.
- [10] M. Minhajuddin, K.M. Bijli, F. Fazal, A. Sassano, K.I. Nakayama, N. Hay, L.C. Plataniotis, A. Rahman, Protein kinase C-delta and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt activate mammalian target of rapamycin to modulate NF-kappaB activation and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in endothelial cells, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 4052–4061.
- [11] D. Kong, T. Yamori, Phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors: promising drug candidates for cancer therapy, *Cancer Sci.* 99 (2008) 1734–1740.
- [12] H. Li, I.B. Weinstein, Protein kinase C beta enhances growth and expression of cyclin D1 in human breast cancer cells, *Cancer Res.* 66 (2006) 11399–11408.
- [13] C.K. Cheng, Q.W. Fan, W.A. Weiss, PI3K signaling in glioma—animal models and therapeutic challenges, *Brain Pathol.* 19 (2009) 112–120.
- [14] J.A. Engelman, J. Luo, L.C. Cantley, The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism, *Nat. Rev. Genet.* 7 (2006) 606–619.
- [15] A. Carnero, The PKB/AKT pathway in cancer, *Curr. Pharm. Des.* 16 (2010) 34–44.
- [16] J.R. Bayascas, D.R. Alessi, Regulation of Akt/PKB Ser473 phosphorylation, *Mol. Cell* 18 (2005) 143–145.
- [17] J.C. Resendiz, M.H. Kroll, R. Lassila, Protease-activated receptor-induced Akt activation—regulation and possible function, *J. Thromb. Haemost.* 5 (2007) 2484–2493.
- [18] D.D. Sarbassov, D.A. Guertin, S.M. Ali, D.M. Sabatini, Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex, *Science* 307 (2005) 1098–1101.
- [19] D.A. Cross, D.R. Alessi, P. Cohen, M. Andjelkovich, B.A. Hemmings, Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B, *Nature* 378 (1995) 785–789.
- [20] X.M. Ma, J. Blenis, Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10 (2009) 307–318.
- [21] H.V. Rao, L. Thirumangalakudi, P. Desmond, P. Grammas, Cyclin D1, cdk4, and Bim are involved in thrombin-induced apoptosis in cultured cortical neurons, *J. Neurochem.* 101 (2007) 498–505.
- [22] J.P. Palma-Nicolas, E. Lopez, A.M. Lopez-Colome, PKC isoenzymes differentially modulate the effect of thrombin on MAPK-dependent RPE proliferation, *Biosci Rep.* 28 (2008) 307–317.
- [23] A. Parrales, J.P. Palma-Nicolas, E. Lopez, A.M. Lopez-Colome, Thrombin stimulates RPE cell proliferation by promoting c-Fos-mediated cyclin D1 expression, *J. Cell. Physiol.* 222 (2010) 302–312.
- [24] C. Hecquet, G. Lefevre, M. Valtink, K. Engelmann, F. Mascarelli, Activation and role of MAP kinase-dependent pathways in retinal pigment epithelial cells: ERK and RPE cell proliferation, *Invest Ophthalmol. Vis Sci.* 43 (2002) 3091–3098.
- [25] W. Ouyang, J. Li, Q. Ma, C. Huang, Essential roles of PI-3K/Akt/IKKbeta/NFkappaB pathway in cyclin D1 induction by arsenite in JB6 Cl41 cells, *Carcinogenesis* 27 (2006) 864–873.
- [26] J.R. Alt, J.L. Cleveland, M. Hannink, J.A. Diehl, Phosphorylation-dependent regulation of cyclin D1 nuclear export and cyclin D1-dependent cellular transformation, *Genes Dev.* 14 (2000) 3102–3114.
- [27] J.A. Diehl, M. Cheng, M.F. Roussel, C.J. Sherr, Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization, *Genes Dev.* 12 (1998) 3499–3511.
- [28] C.W. Chang, R.S. Roque, D.M. Defoe, R.B. Caldwell, An improved method for isolation and culture of pigment epithelial cells from rat retina, *Curr. Eye Res.* 10 (1991) 1081–1086.
- [29] M. Hollborn, C. Petto, A. Steffen, S. Trettner, A. Bendig, P. Wiedemann, A. Bringmann, L. Kohen, Effects of thrombin on RPE cells are mediated by transactivation of growth factor receptors, *Invest Ophthalmol. Vis Sci.* 50 (2009) 4452–4459.
- [30] P. Girard, G. Mimoun, I. Karpouzias, G. Montefiore, Clinical risk factors for proliferative vitreoretinopathy after retinal detachment surgery, *Retina* 14 (1994) 417–424.
- [31] H. Cao, N. Dronadula, G.N. Rao, Thrombin induces expression of FGF-2 via activation of PI3K-Akt-Fra-1 signaling axis leading to DNA synthesis and motility in vascular smooth muscle cells, *Am J Physiol. Cell Physiol.* 290 (2006) C172–C182.
- [32] S. Kim, J. Jin, S.P. Kunapuli, Akt activation in platelets depends on Gi signaling pathways, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 4186–4195.
- [33] A. Rahman, A.L. True, K.N. Anwar, R.D. Ye, T.A. Voyno-Yasenetskaya, A.B. Malik, Alpha(q) and Gbetagamma regulate PAR-1 signaling of thrombin-induced NF-kappaB activation and ICAM-1 transcription in endothelial cells, *Circ. Res.* 91 (2002) 398–405.
- [34] S.H. Byeon, S.C. Lee, S.H. Choi, H.K. Lee, J.H. Lee, Y.K. Chu, O.W. Kwon, Vascular endothelial growth factor as an autocrine survival factor for retinal pigment epithelial cells under oxidative stress via the VEGF-R2/PI3K/Akt, *Invest Ophthalmol. Vis Sci.* 51 (2010) 1190–1197.
- [35] M. Hollborn, A. Bringmann, F. Faude, P. Wiedemann, L. Kohen, Signaling pathways involved in PDGF-evoked cellular responses in human RPE cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 344 (2006) 912–919.
- [36] S.W. Chung, J.W. Park, S.A. Lee, S.K. Eo, K. Kim, Thrombin promotes proinflammatory phenotype in human vascular smooth muscle cell, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 396 (2010) 748–754.
- [37] D.R. Alessi, P. Cohen, Mechanism of activation and function of protein kinase B, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8 (1998) 55–62.
- [38] K. Yu, P. Ma, J. Ge, C.D. Willey, P. Yang, Z. Wang, Q. Gao, Expression of protein kinase C isoforms in cultured human retinal pigment epithelial cells, *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 245 (2007) 993–999.
- [39] S. Yano, H. Tokumitsu, T.R. Soderling, Calcium promotes cell survival through CaM-K kinase activation of the protein-kinase-B pathway, *Nature* 396 (1998) 584–587.
- [40] Y. Cheng, L. Yan, X. Ren, J.M. Yang, eEF-2 kinase, another meddler in the "Yin and Yang" of Akt-mediated cell fate? *Autophagy* 7 (2011) 660–661.
- [41] R. Goel, P.J. Phillips-Mason, D.M. Raben, J.J. Baldassare, alpha-Thrombin induces rapid and sustained Akt phosphorylation by beta-arrestin1-dependent and -independent mechanisms, and only the sustained Akt phosphorylation is essential for G1 phase progression, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 18640–18648.
- [42] F. Oriente, P. Formisano, C. Miele, F. Fiory, M.A. Maitan, G. Vigliotta, A. Trencia, S. Santopietro, M. Caruso, E. Van Obberghen, F. Beguinot, Insulin receptor substrate-2 phosphorylation is necessary for protein kinase C zeta activation by insulin in L6h1R cells, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 37109–37119.
- [43] R.W. Matheny Jr., M.L. Adamo, Current perspectives on Akt activation and Aktions, *Exp. Biol. Med.* (Maywood) 234 (2009) 1264–1270.