



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR  
DIVISIÓN DE NEUROCIENCIAS  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA ACTIVACIÓN DE LA CINASA DE  
ADHESIÓN FOCAL pp125 FAK INDUCIDA POR TROMBINA EN CÉLULAS DEL  
EPITELIO PIGMENTADO DE LA RETINA (EPR)**

**T E S I S**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

**PRESENTA:**

**BIÓL. EDUARDO DANIEL AGUILAR SOLIS**

**TUTOR PRINCIPAL:**

**DRA. ANA MARÍA LÓPEZ COLOMÉ  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR-UNAM**

**COMITÉ TUTOR:**

**DRA. MARTHA ROBLES FLORES  
FACULTAD DE MEDICINA-UNAM**

**DR. YONATHAN OMAR GARFIAS BECERRA  
FACULTAD DE MEDICINA, UNIDAD PERIFÉRICA-UNAM"**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX., NOVIEMBRE 2017**



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.


LIC. IVONNE RAMÍREZ WENCE  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina en su sesión ordinaria del día 09 de octubre de 2017, aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno, **AGUILAR SOLIS EDUARDO DANIEL** con número de cuenta **305287001** con la tesis "**Caracterización bioquímica de la activación de la cinasa de adhesión focal pp125 FAK inducida por trombina en células del epitelio pigmentado de la retina (EPR)**", realizada bajo la dirección de la **DRA. ANA MARÍA LÓPEZ COLOMÉ**:

Presidente: DR. JESÚS ADOLFO GARCÍA SAINZ  
Vocal: DRA. ROCÍO SALCEDA SACANELLES  
Secretario: DRA. MARTHA ROBLES FLORES  
Suplente: DRA. ERIKA PATRICIA RENDÓN HUERTA  
Suplente: DRA. ANNIE PARDO CEMO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 27 de octubre de 2017

  
**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**  
COORDINADOR DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

## **AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES:**

Agradezco al programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y las instituciones que contribuyeron con esta investigación: al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el donativo número 254333 proporcionado a la Dra. Ana María López Colomé así como por el estímulo económico brindado al número de becario: 62847. Asimismo, agradezco al programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM por el donativo para el proyecto (IN205317/28) y a la unidad del bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

De la misma forma, agradezco a mi tutor principal, Dra. Ana María López Colomé y a los técnicos académicos, Q.F.B Edith Catalina López Hernández y Dra. Irene Lee Rivera por darme un lugar en su laboratorio, por sus enseñanzas, consejos y por brindarme una excelente dirección académica.

Finalmente, agradezco al comité tutor de este proyecto integrado por Dra. Martha Robles Flores y Dr. Yonathan Omar Garfias Becerra por sus valiosas contribuciones, así como a los miembros del jurado de examen de grado que enriquecieron este trabajo con sus oportunas observaciones.



## **AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL**

A los integrantes del laboratorio AL-304, en especial para Oscar Amaury Aguilar Lomas, Regina Benavides Hidalgo, Erik Alejandro Alvarez Arce y Sergio de Jesús Jaime Rodríguez, por su compañía y su desinteresada amabilidad.

A mis amigos del Instituto de Fisiología Celular: Susana Hernández Ramírez, Berenice Nohemi Bernal Vicente, Josué Orlando Ramírez Jarquín, Jonathan Enrique Pacheco Romero y Alberto Ramos Morales, gracias por todo.

Para mis padres y para ti .



## ÍNDICE

|   |           |
|---|-----------|
| Abstract .....  | 1         |
| Acronimos/Abreviatura .....   | 3         |
| <b>1. Introducción</b>  |           |
| 1.1 La retina en la función visual .....  | 5         |
| 1.2 Las membranas basales de la retina .....  | 8         |
| 1.3 El EPR en la función visual .....   | 10        |
| 1.4 La vitreorretinopatía proliferativa .....   | 13        |
| 1.5 La trombina y los receptores activados por proteasas .....  | 16        |
| 1.6 Migración celular y adhesiones focales .....  | 20        |
| 1.7 La cinasa de adhesión focal .....   | 26        |
| <b>2. Planteamiento del problema .....</b>  | <b>31</b> |
| <b>3. Hipótesis .....</b>   | <b>32</b> |
| <b>4. Objetivo general .....</b>  | <b>32</b> |
| <b>4.1 Objetivos particulares .....</b>   | <b>32</b> |
| <b>5. Materiales y métodos</b>  |           |
| 5.1 Reactivos utilizados .....  | 33        |
| 5.2 Cultivo primario del EPR de rata .....  | 34        |
| 5.3 Inmunodetección de proteínas .....  | 35        |
| 5.4 Viabilidad celular .....  | 36        |
| 5.5 PCR de FAK .....  | 36        |
| 5.6 Silenciamiento de FAK .....   | 37        |
| 5.7 Ensayo de migración celular .....   | 38        |
| 5.8 Inmunoprecipitación de FAK .....  | 39        |
| <b>6. Resultados</b>  |           |
| 6.1 La trombina estimula la fosforilación de Y576/577 de FAK .....  | 41        |
| 6.2 La trombina induce la fosforilación de Y576/577 a través de la activación de PAR-1 .....                                      | 43        |
| 6.3 La migración de las células del EPR inducida por trombina requiere la expresión de FAK .....                                  | 45        |
| 6.4 La fosforilación de Y576/577 inducida por la trombina promueve el desensamble de las adhesiones focales .....                 | 47        |
| 6.5 La vía de señalización PI3K/PKC $\zeta$ inducida por la trombina media la fosforilación de los residuos Y576/577 de FAK ..... | 49        |

|   |           |
|---|-----------|
| 6.6 La inhibición de las isoformas c/n PKC inducen la hiperforilación de los residuos Y576/577 de FAK ..... | 52        |
| <b>7.Discusión .....</b>  | <b>54</b> |
| <b>8.Conclusiones .....</b>   | <b>59</b> |
| <b>9. Literatura citada .....</b>   | <b>60</b> |
| <b>10. Apéndice .....</b>   | <b>67</b> |

## RESUMEN

La migración de las células del epitelio pigmentado de la retina (EPR) es un paso importante en varias condiciones patológicas oculares incluyendo la neovascularización subretinal (NSR), la vitreorretinopatía proliferativa (VRP) y de manera importante como consecuencia de cirugías retinales. Por lo tanto, la elucidación de los mecanismos subyacentes a la transformación de las células del EPR es esencial para idear tratamientos efectivos dirigidos a la prevención de estos padecimientos. Un evento común en estas patologías es la alteración de la barrera hematorretiniana (BHR) que permite la interacción de las células del EPR con la trombina, una proteasa pro-inflamatoria contenida en el suero sanguíneo. Estudios previos han demostrado que la trombina induce la remodelación del citoesqueleto y la migración de las células del EPR, procesos característicos en el desarrollo de la VRP, sin embargo, los mecanismos moleculares involucrados se desconocen en gran medida. La migración celular requiere el desensamble de adhesiones focales inducido por la fosforilación de la cinasa de adhesión focal (FAK). El objetivo del presente trabajo fue identificar la vía de señalización inducida por la trombina que conduce a la fosforilación de FAK, así como su participación en la migración de las células del EPR. Los resultados demuestran que la activación del receptor activado por proteasas 1 (PAR-1) por la trombina induce la fosforilación de FAK en sus residuos Y576/577 a través de la participación de las isoformas convencionales y nuevas (c/n) de la PKC, PI3K/PKC- $\zeta$  así como de Rho/ROCK ya que la inhibición de estas vías impide la fosforilación de FAK y el consecuente desensamble de las adhesiones focales. Estos hallazgos demuestran por primera vez que la migración de



las células del EPR se regula por la fosforilación en los residuos de tirosina de FAK y esto podría proporcionar una base estratégica para el tratamiento de la VRP al retardar la migración de células del EPR hacia la cavidad del cuerpo vítreo y prevenir la formación de membranas celulares contractiles.

## **ABSTRACT**

The migration of retinal pigment epithelial (RPE) cells is an important step in various pathologic conditions including subretinal neovascularization (SRN), proliferative vitreoretinopathy (PVR) and, importantly, as a consequence of retinal surgery. Therefore, the elucidation of the mechanisms underlying RPE transdifferentiation and migration is essential for devising effective treatments aimed to the prevention of these disorders. A common event in these pathologies is the alteration of the blood-retina barrier (BRB), which allows the interaction of RPE cells with thrombin, a pro-inflammatory protease contained in serum. Our previous work has demonstrated that thrombin induces RPE cell cytoskeletal remodeling and migration, hallmark processes in the development of PVR; however, the molecular mechanisms involved are still unclear. Cell migration requires the disassembly of focal adhesions induced by Focal Adhesion Kinase (FAK) phosphorylation, together with the formation of actin stress fibers. The aim of the present work was to identify thrombin-activated signaling pathways leading to FAK phosphorylation and to determine FAK participation in thrombin-induced RPE cell migration. Results demonstrate that the activation of PAR1 by thrombin induces phosphorylation of Y576/577 within the activation loop. FAK phosphorylation was shown to be under the control of c/nPKC and PI3K/PKC- $\zeta$ , as well as by Rho/ROCK, since the inhibition of these pathways prevented thrombin-induced FAK phosphorylation and the consequent disassembly of focal adhesions and RPE cell migration. These findings demonstrate, for the first time, that thrombin

stimulation of RPE cell transformation and migration are regulated by FAK tyrosine phosphorylation. Thus, targeting FAK phosphorylation may provide a strategical basis for PVR treatment.

## **ABREVIATURAS/ACRÓNIMOS**

**AMPC** Adenosín monofosfato cíclico

**BHR** Barrera hematorretiniana

**DAG** Diacilglicerol

**EGF** Factor de crecimiento epidérmico

**EPR** Epitelio pigmentado de la retina

**ERK1/2** Cinasas de proteína reguladas por señales extracelulares 1 y 2

**ERM** Ezrina/radixina/moesina

**FA** Adhesión focal

**FAK** Cinasa de adhesión focal

**FGF** Factor de crecimiento de fibroblastos

**GDP** Guanosín difosfato

**GEF** Factor intercambiador de nucleótidos de guanina

**GPCR** Receptor acoplado a proteínas G

**GTP** Guanosín trifosfato

**IFN** Interferón

**IP3** Inositol-1,4,5-trifosfato

**MAPK** Cinasa de proteína activada por mitógeno

**MEC** Matriz extracelular

**MLK** Cadena ligera reguladora de la miosina

**PAR** Receptor activado por proteasas

**PI3K** Fosfatidilinositol-3-cinasa

**PIP3** Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato

**PKA** Cinasa de proteína A

**PKB/AKT** Cinasa de proteína B

**PKC** Cinasa de proteína C

**aPKC** PKC atípicas

**cPKC** PKC convencionales

**nPKC** PKC nuevas

**PLC** Fosfolipasa C

**PDGF** Factor de crecimiento derivado de plaquetas

**ROCK** Cinasas de residuos de serina/treonina Rho-cinasa/ROK $\alpha$ /ROCK-II y

p160ROCK/ROCK $\beta$

**SFB** Suero fetal de bovino

**TEM** Transición epitelio-mesénquima

**TGF- $\beta$**  Factor de crecimiento transformante  $\beta$

**TNF** Factor de necrosis tumoral

**VEGF** Factor de crecimiento endotelial  
vascular

**VRP** Vitreorretinopatía proliferativa



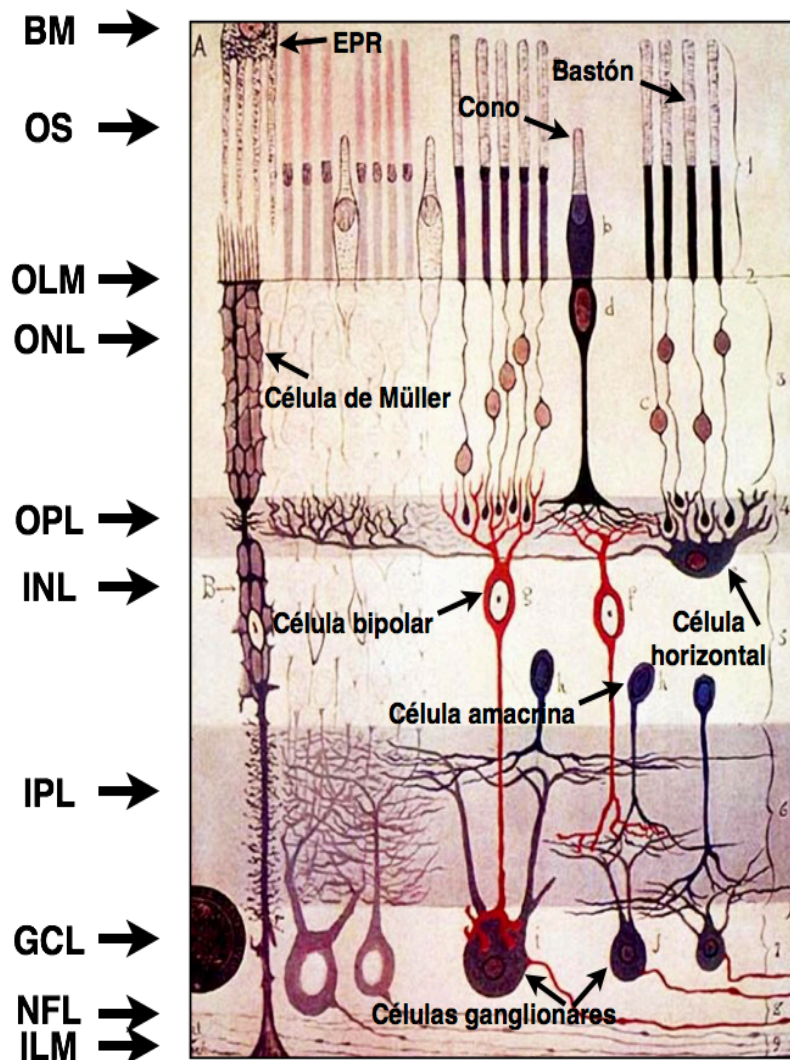
## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1 LA RETINA EN LA FUNCIÓN VISUAL.**

La visión en los mamíferos inicia cuando los fotones que componen la luz pasan a través de la córnea y las demás estructuras del ojo para finalmente enfocarse sobre la retina. La retina (Figura 1), es un tejido neural imprescindible para la visión que se encuentra en la porción posterior del glóbulo ocular y cuya arquitectura laminar se encuentra meticulosamente polarizada. Su principal función es convertir el estímulo visual, compuesto por fotones, en actividad bioquímica, para que el cerebro la pueda interpretar mediante un proceso denominado fototransducción <sup>1</sup>. La fototransducción, se realiza en los segmentos externos de los fotorreceptores, conos y bastones (OS), que pertenecen a la capa nuclear externa (ONL) de la retina, Posteriormente, a través de cambios en el potencial de membrana de los OS, el estímulo visual se transmite por la sinapsis hacia las neuronas de segundo nivel o interneuronas de la retina (células horizontales, células bipolares y células amacrinas), cuya principal función es modular el estímulo visual. En conjunto, las interneuronas forman una capa denominada, capa nuclear interna (INL). Hay que mencionar, además que entre la ONL y la INL, se encuentra una capa intermedia denominada como capa plexiforme externa (OPL) que es el sitio en donde se realizan las conexiones sinápticas entre los OS y las interneuronas. Las redes formadas por las conexiones sinápticas de las interneuronas de la retina son sumamente complejas debido a que conducen una vasta cantidad de información visual por múltiples caminos, con la finalidad de que llegue a las células ganglionares de la retina (GC). Las GC se consideran el único tipo de neuronas de proyección en la retina ya que a través del entrelazamiento de sus axones conforman

al nervio óptico, que conduce el estímulo visual hacia distintas estructuras en el cerebro para su interpretación en color, movimiento, tamaño, orientación y textura, además, es importante mencionar que en conjunto las GC forman una capa más de la retina denominada capa de las células ganglionares (GCL) <sup>2,3</sup>.

Además de estas capas, se sabe de la presencia de dos membranas basales en la retina, así como de un tipo de células epiteliales denominadas células del epitelio pigmentado de la retina (EPR), de las que hablaremos con detalle más adelante. Con respecto a las membranas basales, la primera se localiza en la porción más anterior de la retina y se conoce como membrana limitante interna (ILM) y la segunda membrana basal, se encuentra en la porción más posterior de la retina y se nombró membrana de Bruch (BM), en honor al anatomista alemán Karl Wilhelm Ludwig Bruch, quien la describió <sup>4</sup>.



**Figura 1.** Capas de la retina en mamíferos.

Los transductores de la luz, los fotorreceptores (conos y bastones) (**OS**), situados en la porción más posterior de la retina, se encuentran interactuando con las células del epitelio pigmentario de la retina (**EPR**), que a su vez se adhieren a la membrana de Bruch (**BM**). Inmediatamente abajo, inicia la membrana limitante externa (**OLM**) que está formada por un tipo de células gliales denominadas células de Müller, cuyos axones se extienden por todo el espesor de la retina, desde los fotorreceptores hasta la membrana limitante interna (**ILM**). Mezclada con la OLM se encuentra la capa nuclear externa (**ONL**) que contiene los cuerpos celulares de los OS, así como, la capa nuclear interna (**INL**) que contiene los cuerpos celulares de las interneuronas (células bipolares, horizontales y amacrinas). Entre la INL y la ONL, se encuentra una capa sináptica o plexiforme (**OPL**), en donde se realizan las conexiones entre los OS y las interneuronas. De igual forma, en la capa plexiforme interna (**IPL**) las interneuronas realizan sinapsis con las células ganglionares que a su vez constituyen a la capa de células ganglionares de la retina (**GCL**). Los axones entrelazados de las células ganglionares conforman el nervio óptico que atraviesa una capa de fibras nerviosas (**NFL**) que se encuentra apoyada sobre la membrana limitante interna (**ILM**) para finalmente proyectarse hacia el cerebro. Figura tomada y modificada de <sup>154</sup>.

## **1.2 LAS MEMBRANAS BASALES DE LA RETINA**

En todos los metazoarios, los diversos componentes de la matriz extracelular (MEC) se encuentran organizados en láminas delgadas y especializadas a las que en conjunto se les conoce como membranas basales <sup>5</sup>. Las principales funciones de las membranas basales de la retina son: (i) Actuar como superficies de adhesión para el resto de las células, (ii) proveer de soporte estructural al tejido, (iii) compartimentar y (iv) regular aspectos fundamentales del comportamiento celular como la polarización celular <sup>6</sup>, que a su vez se ha visto sucede en prácticamente todos los tipos celulares, incluyendo a la retina <sup>7-10</sup>. Asimismo, diversos estudios en modelos animales con deleciones o mutaciones en genes que codifican para proteínas de la MEC, apoyan la idea de que las membranas basales regulan más procesos celulares esenciales, por ejemplo: la supervivencia, proliferación, diferenciación y migración celular <sup>11,12</sup>. Aunado a esto, se ha visto que diversos factores de crecimiento se encuentran retenidos en las membranas basales, haciéndolas un reservorio biológico, hecho que aumenta significativamente su complejidad en cuanto a función <sup>13-15</sup>. Asimismo, se ha demostrado que la composición de cada membrana basal es específica para cada tejido de nuestro cuerpo y además esta composición se va modificando a lo largo del desarrollo <sup>16,17</sup>. Particularmente en la retina, se ha detectado a través de observaciones histológicas, que la composición de sus dos membranas basales, la BM y la ILM, se encuentra principalmente constituidas por abundantes cantidades de: colágena tipo I, colágena tipo IV, fibronectina y laminina <sup>18-20</sup>. Por lo que se ha sugerido la importancia de estas moléculas para facilitar la adhesión de los demás tipos celulares de la retina <sup>6,13,21,22</sup>.

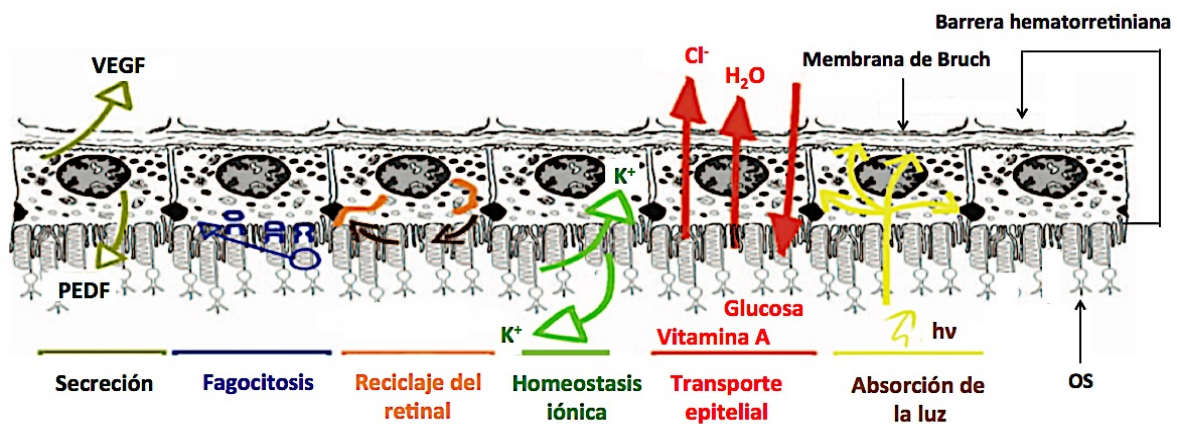
Además, se sabe que distintas patologías se ocasionan por defectos en la síntesis de los componentes de las membranas basales. Baste como muestra, el síndrome de Alport, enfermedad producida por alteraciones en la síntesis de la colágena tipo IV, que produce importantes defectos en la ILM que provocan deficiencias para mantener la estructura laminar de la retina e impedir la migración de astrocitos durante el desarrollo de la misma <sup>21,23,24</sup>.

En cuanto a complejidad, la BM se considera más compleja que la ILM, ya que se encuentra conformada por cinco capas, que enumeradas desde la más posterior a la más anterior son: (i) la capa que actúa como membrana basal de las células del EPR, (ii) la capa interna de colágena, (iii) la capa central de fibras elásticas, (iv) la capa de colágena externa, y (v) la capa que actúa como membrana basal de los coriocapilares. Aunado a su complejidad estructural, se sabe que la BM en conjunto con las células de epitelio pigmentado de la retina (EPR), forman una parte importante de la barrera hematorretiniana (BHR). La BHR controla de manera estricta el transporte de líquidos y solutos hacia los fotorreceptores de la retina y además, impide la entrada de moléculas tóxicas y componentes del plasma sanguíneo hacia las neuronas de la retina, previniendo así alteraciones y posteriormente malformaciones que provoquen ceguera <sup>24</sup>. En resumen, la correcta síntesis y localización de los componentes de las membranas basales de la retina (ILM y BM), son esenciales para conservar la integridad de la retina y por lo tanto la función visual <sup>4,25</sup>.



### 1.3 EL EPR EN LA FUNCIÓN VISUAL

Las células del EPR, son el único tipo de célula no neural presente en la retina, aunque se considera parte de la misma dado que comparten el mismo origen embrionario (neuroectodérmico) <sup>25</sup>. Histológicamente, las células del EPR se encuentran organizadas en un tejido monoestratificado, en el que cada célula posee una morfología cuboidal <sup>26</sup> (Figura 2). A través de su cara apical, cada célula del EPR, establece una compleja relación estructural con los OS de la retina, por lo que su presencia e integridad es de suma importancia para su correcto funcionamiento <sup>25</sup>.



**Figura 2.** Resumen de las funciones del EPR.

**OS**, Fotorreceptores, **VEGF**, Factor de crecimiento endotelial vascular, **PEDF**, Factor de crecimiento derivado de epitelio. Figura tomada y modificada de <sup>25</sup>.

Las principales funciones del EPR son aumentar la calidad óptica de la visión y proteger a los OS de la foto-oxidación al absorber los excesos de fotones a través de los gránulos de melanina presentes en sus melanosomas <sup>27,28</sup>. Asimismo, los protege físicamente, envolviéndolos a través de largas microvellosidades. También, se ha demostrado que las células del EPR secretan distintos factores que ayudan en la

supervivencia y diferenciación de los OS <sup>29-31</sup> y es debido a esta actividad secretora que se considera al EPR un componente importante para hacer de la retina un sitio inmunológicamente privilegiado <sup>32,33</sup>. Además, se sabe que el EPR participa en el intercambio de agua y nutrientes como: glucosa, ácidos grasos y retinal, del espacio en donde se encuentran las interneuronas hacia la sangre y viceversa. El retinal, es la molécula a través de la que los fotorreceptores se mantienen excitables y constantemente se recicla a través de la digestión de los segmentos externos de los fotorreceptores, sitio en donde se encuentra, para posteriormente translocar a las células del EPR en donde se re-isomeriza, este proceso se conoce como “ciclo del retinal”. Finalmente, se sabe que las células del EPR estabilizan la concentración de iones del espacio interneuronal, colaborando también para mantener la excitabilidad de los fotorreceptores <sup>25</sup>.

Además de las complejas funciones e interacciones estructurales que establecen las células del EPR a través de su cara apical con los fotorreceptores, se sabe, que por medio de su cara baso lateral, las células del EPR interaccionan con la membrana de Bruch, cuya principal función, como se mencionó anteriormente, es proporcionar una superficie de adhesión para las células del EPR y el resto de la retina, así como, formar parte importante de la BHR <sup>4,25</sup>. La manera en la que el EPR establece contacto con la BM, es a través de receptores transmembranales de la familia de las integrinas. Estos receptores conectan a los componentes de la BM con el citoesqueleto de las células del EPR, induciendo así la formación de sitios de asociación denominados adhesiones focales (FA) <sup>34,35</sup> de las que se profundizará en su explicación más adelante. No obstante, es importante aclarar que aunque el termino de FA sea el más usado

actualmente, durante los primeros años de su estudio, se les denominaba placas de adhesión <sup>36</sup> o contactos focales <sup>37</sup>. Como consecuencia de la formación de las FA, se produce la propagación de señales intracelulares de supervivencia hacia el núcleo celular a través de moléculas del citoesqueleto, como actina o tubulina <sup>38,39</sup>. Alteraciones en la formación de las FA, han sido reportadas como causas importantes de malformaciones y patologías de riñón, músculo, piel, cerebro y retina <sup>40-43</sup>. A propósito de las patologías de la retina, de acuerdo con la Organización Mundial para la Salud (OMS), se estima que en el mundo existen alrededor de 285 millones de personas con algún tipo de discapacidad visual, de las cuales, 39 millones son ciegas totales y 264 millones padecen de alguna enfermedad relacionada con la visión. La mayor cantidad de patologías que provocan ceguera se suelen presentarse principalmente en la porción posterior del ojo, es decir en donde se encuentra la retina. Una de las patologías más graves, que de no diagnosticarse tempranamente puede conducir a la ceguera, es el desprendimiento de la retina (DR), que consiste en la separación física entre las neuronas de la retina y las células del EPR. Este padecimiento puede ocurrir a cualquier edad, aunque con mayor frecuencia suele presentarse en individuos de edad media o en personas de la tercera edad. Asimismo, personas con niveles altos de miopía o aquellos que hayan padecido algún trastorno en la retina (p. ej. Retinopatía diabética) suelen ser más propensos a desarrollar un DR, sin embargo, una contusión fuerte también puede ocasionarlo <sup>44</sup>. De la misma forma, pero con menor frecuencia, se sabe que los DR también están relacionados con enfermedades hereditarias (p. ej. En el síndrome de Wagner-Stickler)<sup>18,42</sup>.

La mayoría de los DR son causados por la presencia de rupturas en la retina. Una vez que se ha diagnosticado el problema y se ha evaluado la lesión, existen varios procedimientos quirúrgicos a los que el paciente se puede someter (p. ej. La cirugía escleral, la vitrectomía o la retinopexia neumática) con la finalidad de reincorporar los desprendimientos. Sin embargo, los tipos de cirugía existentes para la corrección de los DR, son de mayor riesgo en comparación con otros tipos de procedimientos quirúrgicos oculares (p. ej. La corrección de cataratas o defectos refractivos) y existe una gran probabilidad de que la reincorporación de la retina se complete en más de una cirugía. Factores de mal pronóstico para la recuperación del paciente son: diabetes, miopía elevada o la presencia de múltiples desgarros en una localización muy posterior en la retina. Asimismo, se pueden presentar diversas complicaciones *postcirugía* como: nuevos desgarros o nuevos desprendimientos, aumento de la presión intraocular, formación de cataratas o infecciones. Dejando de lado estas dos últimas complicaciones, el resto se suele asociar bajo el término de vitreorretinopatía proliferativa (VRP) y hoy en día se considera el obstáculo más significativo para el éxito de las cirugías por DR <sup>45</sup>.

#### **1.4 LA VITREORRETINOPATÍA PROLIFERATIVA**

El término de vitreorretinopatía proliferativa (VRP) se acuñó en 1983 por el comité de terminología de la sociedad de la retina <sup>46</sup> para describir una serie de complicaciones tras una cirugía ocular, principalmente en cirugías por DR. Se calcula que existe  $\approx 75\%$  de riesgo de desarrollar VRP tras una cirugía ocular (p. ej. para reparar un DR), con un 5-10% de riesgo acumulado tras cada nuevo procedimiento <sup>47</sup>.

Actualmente, se sabe que la patogénesis de la VRP (Figura 3) se ocasiona en gran parte por alteraciones en la BHR. Estas alteraciones, incrementan la actividad mitogénica y quimiotáctica en la cavidad del cuerpo vítreo del ojo debido al ingreso de diversos componentes del plasma sanguíneo que promueve la migración, proliferación y formación de membranas contráctiles, principalmente de las células del EPR <sup>48</sup>, que fisiológicamente son quiescentes <sup>49</sup>. Las contracciones de estas membranas ocasionan la pérdida de la arquitectura de la retina y subsecuentemente inducen más desprendimientos de retina en distintos puntos conduciendo al paciente paulatinamente hacia la ceguera <sup>46</sup>. Asimismo, se sabe que las células del EPR se desdiferencian hacia morfologías parecidas a fibroblastos o macrófagos. Este proceso de desdiferenciación involucra la activación de una compleja maquinaria molecular conocida como “transición epitelio-mesénquima” (TEM) <sup>48-50</sup>.

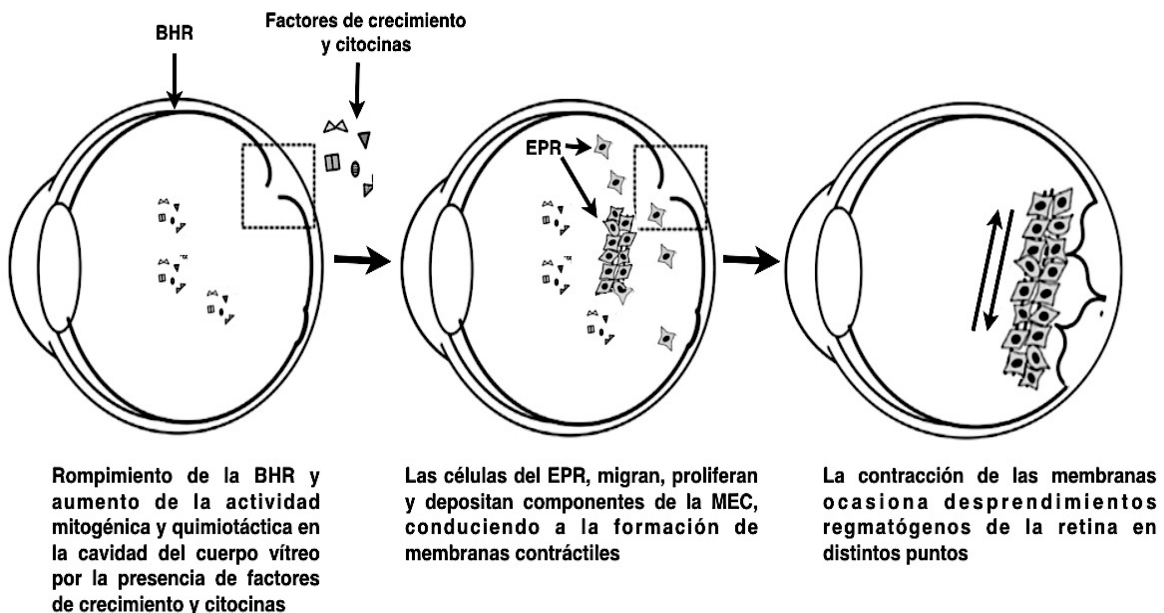


Figura 3. **Patogénesis de la VRP**

**BHR.** Barrera hematorretiniana, **EPR,** Epitelio Pigmentado de la Retina. Figura tomada y modificada de <sup>52</sup>.

La TEM es el proceso biológico en el que las células polarizadas pierden sus características. En el caso de las células del EPR, la TEM ocasiona la adquisición de un fenotipo de mesénquima que favorece el aumento de su capacidad de invasión y migración debido a la pérdida de las adhesiones célula-célula <sup>51</sup>. Además, se ha visto que la TEM ocasiona resistencia a la apoptosis y aumentos en la síntesis de  $\alpha$ -actina de músculo liso, proteína fibrilar ácida de la glía, vimentina y diversas proteínas de MEC <sup>49</sup>. Actualmente, se conocen diversas vías de señalización intracelular, principalmente iniciadas por factores de crecimiento, que son activadores del proceso de TEM (p. ej. PDGF, HGF, VEGF, EGF, TGF $\alpha$ , TGF- $\beta$ , G-CSF, FGF, IGF-1 y CTGF) <sup>52,53</sup>.

Particularmente en la retina, se ha visto que algunos de estos factores se sintetizan por las células gliales de la retina o por las mismas células del EPR, cuando pierden contacto con los fotorreceptores <sup>50</sup>. Específicamente en las células del EPR, las vías de señalización más estudiadas han sido: la vía inducida por el receptor para el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), del que se demostró, actúa como un potente mitógeno estimulando la proliferación de las células del EPR y también como un quimioatrayente para las células gliales de la retina <sup>53</sup>. Otro ejemplo ampliamente estudiado de un mediador molecular encontrado durante la TEM de las células del EPR y la patogénesis de la VRP es el factor de crecimiento TGF- $\beta$ , que a través de su señalización por medio de las proteínas SMAD3 y SMAD7 inducen cambios morfológicos en las células del EPR, así como, aumentos en la síntesis de MEC <sup>54,55</sup>. Diversas moléculas más se han asociado con el desarrollo de la VRP (p. ej. Interleucinas -1,-6,-8,-10, MCP-1 e interferón  $\gamma$ ) <sup>52,53</sup>. En clínica, la presencia y concentración de estos factores de crecimiento han sido propuestos como marcadores

para predecir el desarrollo y la gravedad de la VRP <sup>56,57</sup>, sin embargo, estas citocinas no son específicas de esta patología dado que su presencia está asociada con otros desordenes de la retina <sup>53,57</sup>. Por último, lamentablemente, desde su descripción original no se han reportado avances relevantes en torno al tratamiento de la VRP <sup>52</sup> y por lo tanto, los agentes causales así como los mecanismos moleculares de la enfermedad continúan siendo objeto de investigación. Debido a esto, diversos estudios publicados por nuestro grupo de trabajo han propuesto a la trombina, una proteasa que actúa sobre residuos de serina (Ser), contenida en el suero sanguíneo y más conocida por su importante papel durante la coagulación, como uno de los principales agentes causales de la VRP. Lo anterior se encuentra apoyado en diferentes estudios en donde se ha demostrado que la trombina induce la proliferación, la liberación de factores de crecimiento, la contracción del citoesqueleto celular, la migración de las células del EPR y el inicio de la TEM <sup>58-61</sup>. Los múltiples efectos ejercidos por la trombina sobre las células del EPR, se atribuyen al tipo de receptores sobre los que la proteasa ejerce su actividad, dichos receptores son miembros de la familia de los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) y se les conoce como receptores activados por proteasas (PAR), cuya activación estimula múltiples vías de señalización mediadas por proteínas G heterotriméricas <sup>62</sup>.

### **1.5 LA TROMBINA Y LOS RECEPTORES ACTIVADOS POR PROTEASAS**

Los PAR se consideran miembros únicos y atípicos de la familia de los GPCR debido a la naturaleza proteolítica e irreversible de su activación, condiciones que han dificultado el desarrollo de antagonistas específicos. Diversos estudios en distintos

tipos celulares han logrado dilucidar algunas de las propiedades de señalización y regulación de estos receptores, asociándolos principalmente con funciones vasculares, durante el desarrollo embrionario, en procesos inflamatorios y durante la progresión de distintos tipos de cáncer <sup>63</sup>.

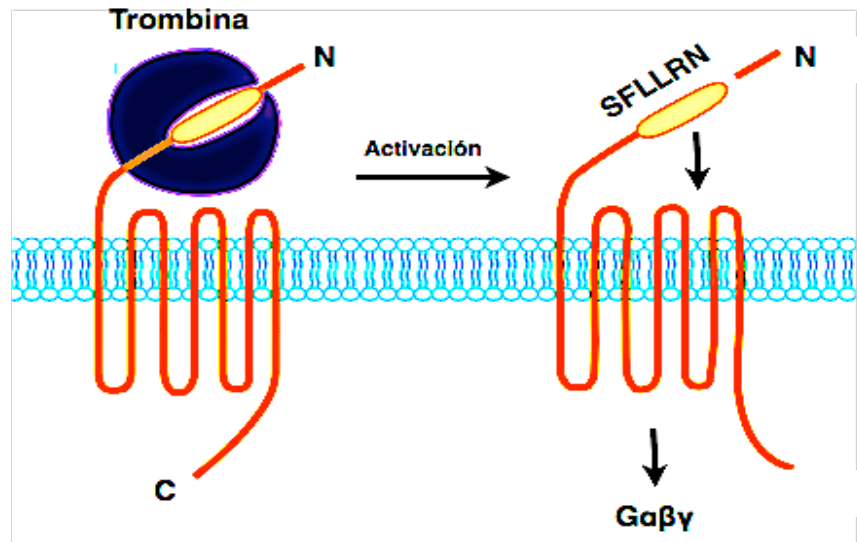
Concretamente, la familia de los PAR está constituida por 4 miembros (PAR-1,-2, -3 y -4) y en el humano existen 4 loci, uno para cada uno de los miembros de la familia<sup>64</sup>. PAR-1, es el receptor prototipo de la familia y además fue el primero en descubrirse <sup>65</sup>, señala intracelularmente a través de las proteínas G heterotriméricas de tipo Gq, Gi/o o G12/13, una vez que ha sido activado por la trombina, así como también lo hacen el PAR-3 y PAR-4, que se identificaron posteriormente en plaquetas de ratón <sup>66</sup>. Por lo que se refiere a PAR-2, se sabe que este no se activa por la trombina, se activa por otras proteasas de serina como la tripsina, una proteasa pancreática <sup>67</sup>.

La forma como la trombina interactúa con los PAR, es a través del reconocimiento de un residuo de serina en el extremo N-terminal, principalmente en los PAR-1, -3 y -4, dicho residuo actúa como el sitio específico de corte (Figura 4). Una segunda interacción molecular ocurre entre aminoácidos presentes en el exosito I de la trombina y la secuencia YEPFWEDEE de los PAR, dando como resultado una especificidad única, principalmente con el PAR-1 y -3 <sup>68</sup> ya que PAR4, carece del sitio de unión para el Exosito I de la trombina y por lo tanto, exhibe una baja afinidad <sup>69</sup>. Sin embargo, existe evidencia en plaquetas murinas, de eventos de heterodimerización en los que el PAR-3, se une al PAR-4, para desencadenar respuestas celulares <sup>66,70</sup>.



La diversidad en la señalización de la familia de los PAR, se atribuye principalmente a la promiscuidad con la que el extremo intracelular C-terminal del receptor interacciona con las proteínas G. Las redes de señalización intracelular formadas por la activación de dichas proteínas G, generan y amplifican distintas señales intracelulares en las que se producen varios segundos mensajeros, los que a su vez activan a una gran cantidad de proteínas induciendo diversos efectos en las células, como proliferación y migración celular. Por ejemplo, se sabe que la activación de la subunidad  $G\alpha_q$  induce la activación de la fosfolipasa  $C\beta$  (PLC- $\beta$ ) la que a su vez induce la formación de inositol 1,4,5-trifosfato ( $IP_3$ ) y diacilglicerol (DAG). Por una parte, el  $IP_3$  incrementa la concentración de calcio ( $Ca^{2+}$ ) citoplasmático e induce la activación de diversas vías de señalización más y, por otro lado, el DAG activa a las isoformas nuevas y convencionales de la familia de la proteína cinasa C (PKC). Brevemente, la familia de la PKC comprende 12 cinasas de serina/treonina que se clasifican en tres subfamilias con base en su mecanismo de activación: las convencionales (cPKC) ( $\alpha$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\gamma$ ) que se activan por diacilglicerol (DAG) y calcio ( $Ca^{2+}$ ), las nuevas (nPKC) ( $\epsilon$ ,  $\delta$ ,  $\theta$ ,  $\eta$ ) que se activan por DAG pero son insensibles a  $Ca^{2+}$  y las atípicas (aPKC) ( $\zeta$  y  $\lambda$ ) que no se activan por DAG ni por  $Ca^{2+}$  <sup>71</sup>. Asimismo, se sabe que las subunidades  $\beta\gamma$  de las proteínas G, actúan de forma independiente y son capaces de activar a la fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K), distintos canales iónicos y otras proteínas con actividad de cinasa. Además, investigaciones recientes han demostrado que los PAR presentan agonismo parcial, es decir, la capacidad del receptor para estabilizarse en distintas conformaciones estructurales únicas como consecuencia de su asociación con diferentes ligandos, induciendo así diferentes respuestas celulares, hecho que

aumenta significativamente la complejidad en su señalización intracelular <sup>62</sup>.



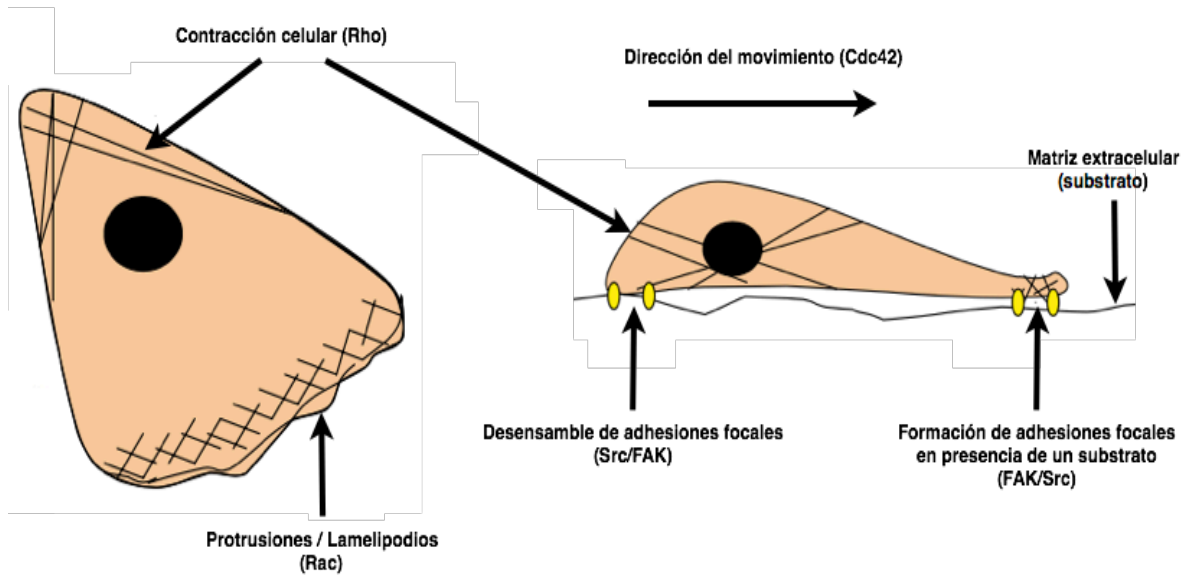
**Figura 4.** Activación proteolítica del PAR-1

La trombina se une a PAR-1 y corta el extremo N-terminal extracelular de PAR-1 ocasionando la generación de un nuevo extremo N-terminal que se une intramolecularmente al receptor iniciando cascadas de señalización dependientes de proteínas G heterotriméricas ( $G\alpha\beta\gamma$ ). Péptidos sintéticos (SFLLRN), pueden activar a PAR-1 independientemente del corte proteolítico de la trombina. **N**= Extremo amino terminal, **C**= Extremo carboxilo terminal. Figura tomada y modificada de <sup>62</sup>.

Finalmente, se sabe que la activación de las proteínas G12/13, ocasionan la subsecuente activación de proteínas intercambiadoras de nucleótidos de guanina de la familia de Rho (RhoGEFs) que a su vez activan a miembros de la familia con actividad GTPasa de esa misma familia y consecuentemente generan la activación de la vía Rho/ROCK <sup>61</sup> que desempeña una función central para regular y reorganizar el citoesqueleto de actina, así como para modificar a las adhesiones celulares, eventos que están íntimamente relacionados con la adhesión y la migración celular <sup>64,72,73</sup>

## **1.6 MIGRACIÓN CELULAR Y ADHESIONES FOCALES**

En los animales, la migración celular es un proceso fundamental para la formación y organización de los tejidos, así como, para el mantenimiento de la integridad corporal ya que participa de forma importante en la cicatrización de heridas. Sin embargo, también es un componente importante de múltiples patologías. Ya sea fisiológica o patológicamente, la migración celular es consecuencia de distintas señales extracelulares (Figura 5) que actúan como iniciadoras o inhibidoras del proceso. Estas señales pueden ser factores solubles que actúan a distancia, señales locales recibidas de células vecinas o señales provenientes de la MEC. Una vez iniciado el proceso de migración, las células pasan por una serie de cambios bioquímicos y morfológicos, entre los más importantes podemos mencionar la pérdida de la polaridad celular, transformaciones morfológicas producidas por modificaciones en la organización del citoesqueleto de actina, contracciones en el cuerpo celular, cambios moleculares que ocasionan la formación de prolongaciones transitorias de la membrana celular (protrusiones, lamelipodios o filopodios), la formación de nuevos sitios de adhesión en el borde frontal de la célula y el desensamble de los sitios de adhesión en la parte posterior. Es importante mencionar que todas estas modificaciones celulares deben producirse al mismo tiempo y en completa coordinación en el espacio y tiempo para generar movimiento <sup>74</sup>.



**Figura 5.** Características bioquímicas del proceso de migración celular.

Las células en proceso de migración requieren de la activación de una serie de proteínas reguladoras del proceso como: Cdc42 que establece la dirección de la migración, la proteína Rac, que induce la formación de protrusiones en el frente celular a través de la estimulación de la polimerización del citoesqueleto de actina, la proteína Rho que promueve la contracción del citoesqueleto de actina a través de la activación de la miosina y el complejo FAK/Src, que promueve el ensamble y desensamble de los complejos de adhesión focal. Figura tomada y modificada de <sup>75</sup>.

Actualmente, se sabe de una gran variedad de moléculas de señalización intracelular que participan en el proceso de migración (p. ej. fosfolipasas, fosfatasa, cinasas de tirosina, cinasas de serina/treonina y distintas proteínas del citoesqueleto). Sin embargo, son escasas las moléculas que desempeñan funciones centrales en la regulación del proceso. Baste como muestra, a los miembros de la ya mencionada familia de Rho (Rac y Cdc42), de los que se ha visto regulan la contracción del citoesqueleto de actina, así como, la formación de protrusiones (lamelipodios y filipodios) en la membrana celular <sup>75-78</sup>. A pesar de la importancia de estas GTPasas en la regulación y organización del citoesqueleto durante la migración celular, se sabe que este proceso es integrado y necesita de la activación de más proteínas, como

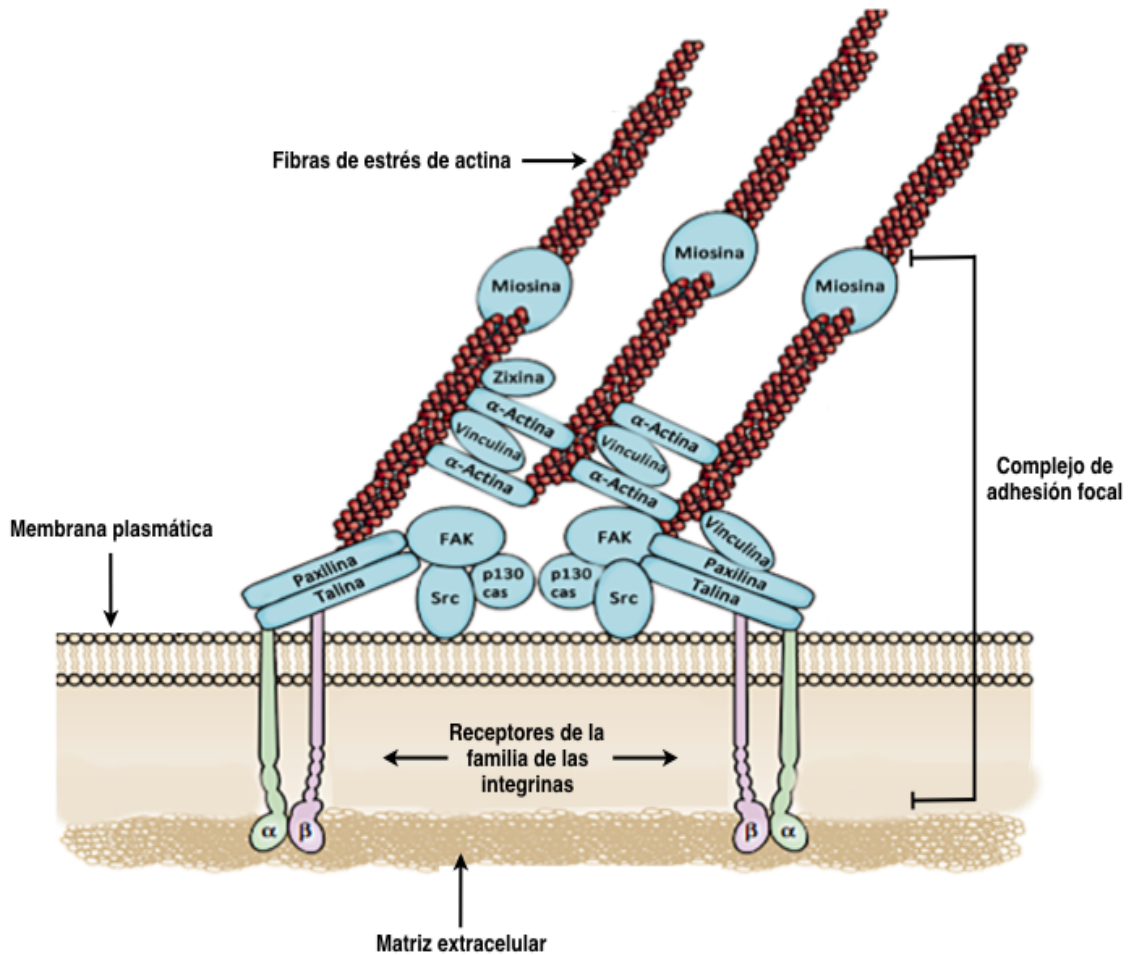
cinastas de tirosina que regulen otros aspectos cruciales como: la formación y el desensamble de las FA para favorecer el movimiento celular. Las FA (Figura 6), son estructuras macromoleculares localizadas en la membrana celular, particularmente, en la cara basolateral. Poseen un tiempo de vida media muy variable que va desde los minutos hasta las horas y su principal función es favorecer la adhesión de las células a las membranas basales <sup>79</sup>. Durante las primeras observaciones de las FA a través de microscopía electrónica, se pensó erróneamente que no eran más que un agrupamiento amorfo de proteínas que interaccionaban sin organización alguna. Sin embargo, con el paso del tiempo y con el uso de nuevas tecnologías, como la microscopía de súper resolución, se han logrado establecer grandes progresos en dilucidar su compleja estructura tridimensional y organización <sup>80-82</sup>. Hoy se sabe que el número de proteínas que pueden estar presentes en una FA puede exceder las 160 y las posibles interacciones entre todos sus componentes se han estudiado matemáticamente en el “diagrama de Geiger” <sup>83,84</sup>. Sin embargo, no se han comprobado experimentalmente.

Actualmente se sabe que los elementos principales que componen la estructura de las FA pueden dividirse en 4 tipos (i) componentes de la MEC, (p. ej. Fibronectina, laminina, vitronectina y colágenas), (ii) proteínas reguladoras (p. ej. FAK, Src y MLK), (iii) proteínas de andamiaje o del citoesqueleto que estabilizan la estructura (p. ej. Actina, miosina, vinculina, paxilina) y (iv) receptores transmembranales, de la familia de las integrinas <sup>85</sup>. Los receptores transmembranales de la familia de las integrinas, son las proteínas de mayor tamaño que componen a las FA y por lo tanto son las piezas centrales de su existencia. Están constituidos por heterodímeros de cadenas  $\alpha$  y

$\beta$  y actualmente se conocen 24 combinaciones en mamíferos <sup>86,87</sup>. Cada posible combinación de heterodímeros es afín a distintas moléculas de la MEC, por ejemplo el heterodímero  $\alpha 5\beta 1$ , se une a fibronectina, mientras que el  $\alpha 3\beta 1$  se une a laminina <sup>88</sup>. Particularmente en las células del EPR, se ha demostrado la presencia de las subunidades  $\alpha V$ ,  $\alpha 1$  y  $\alpha 3$ , así como de las subunidades  $\beta 1$  y  $\beta 3$  <sup>89,90</sup>. La forma como los receptores de integrinas reconocen a sus proteínas ligando, es través de pequeñas secuencias peptídicas de Arg-Gly-Asp (RGD), Asp-Gly-Glu-Ala (DGEA) o Gly-Phe-Pro-Gly-Glu-Arg (GFPGER) en las proteínas de la MEC <sup>91,92</sup>. Por ejemplo, la colágena IV, abundante en las membranas basales de la retina, puede interactuar a través de las múltiples secuencias RGD de su estructura, principalmente con las subunidades de los receptores de integrinas  $\alpha 1\beta 1$  y  $\alpha 2\beta 1$  <sup>18</sup>. Una vez que los diversos componentes de la MEC han establecido contacto con los receptores de integrinas, se induce la estimulación de la subunidad  $\beta$  del receptor y la exposición de dominios de unión proteica en la parte citoplasmática del mismo. Posteriormente, proteínas del citosol, como la talina, enlazan a los receptores de integrinas con el citoesqueleto de actina. Cabe mencionar que la talina puede actuar de manera directa o indirecta a través de su interacción con otras proteínas del citoesqueleto como vinculina o  $\alpha$ -actinina. El reclutamiento de estas primeras proteínas, induce a su vez la incorporación de otras más como: la cinasa de adhesión focal (FAK), paxilina, dinamina, filamina, zixina, y tensina <sup>74</sup>. Como resultado, se obtiene la formación de nuevos sitios de adhesión que con el paso del tiempo maduran y se remodelan ante diversos estímulos <sup>93</sup>.

En contraparte al proceso de ensamblaje de las FA, se encuentra el desensamble, que ha sido menos estudiado además de considerarse más complejo, dado que se sabe

distintas maneras a través de las que se puede producir el fenómeno. Brevemente, una de las formas observadas es a través la degradación de la MEC por efecto de metaloproteinasas que ocasionan la pérdida de adhesión celular. Asimismo, se ha visto que la contracción celular mediada principalmente por la proteína miosina II también ocasiona el desensamble de las FA, de igual forma se sabe que la endocitosis de los receptores de integrinas se regula por las proteínas: dinamina, clatrina y caveolina-1. Finalmente, el aumento en la actividad de ciertas cinasas o proteasas reguladoras de las FA también se ha reportado como uno de los principales acontecimientos que induce el recambio (formación-desensamble) de las FA <sup>74</sup>. Con respecto a este último punto, diversos estudios han señalado a FAK como una de las principales promotoras del recambio de las FA y del inicio de la migración celular, sin embargo, la dinámica de las proteínas reguladoras aún se investiga intensamente ya que no se ha logrado dilucidar si es su localización, orientación o la vía de señalización que las activan la que las inducen a participar en dinámicas tan distintas como lo son el ensamble o desensamble de las FA <sup>94</sup>.



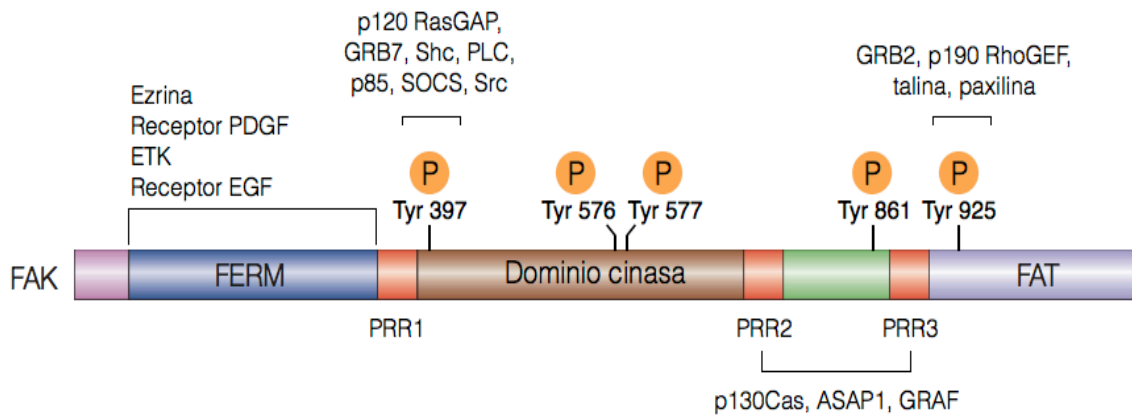
**Figura 5.** Diagrama básico de la estructura de una adhesión focal

Una FA se compone principalmente de proteínas de la MEC, receptores de la familia de las integrinas y diversas proteínas del citoesqueleto celular y proteínas reguladoras de su estructura. Durante su ensamble, las proteínas del citoesqueleto: paxilina y talina, se unen a los dominios citoplasmáticos de los receptores de la familia de las integrinas, estas proteínas, reclutan a su vez, a la cinasa de adhesión focal (FAK). A través de la señalización de FAK, se reclutan otras proteínas de citoesqueleto como la  $\alpha$ -Actina que al ser fosforilada por FAK se une a vinculina y a las fibras de estrés del citoesqueleto de actina-miosina. Las proteínas asociadas a la membrana plasmática, Src y p130Cas, se asocian a las FA después de la agrupación de los receptores de la familia de las integrinas. Zixina es una proteína que se asocia con actina y solo esta presente en las FA maduras. Sin embargo, aunque las proteínas mencionadas anteriormente se encuentran en la mayoría de las FA, su composición suele ser muy variable. Figura tomada y modificada de <sup>99</sup>.



## 1.7 LA CINASA DE ADHESIÓN FOCAL

Han pasado 20 años desde que se identificó por primera vez a FAK<sup>95,96</sup>. A pesar del tiempo, los avances para la comprensión de su señalamiento intracelular, así como su papel durante la migración celular continúan siendo sujeto de estudio<sup>93</sup>. FAK, es una proteína con actividad de cinasa sobre residuos de tirosina evolutivamente conservada en mamíferos que se expresa en la mayoría de los tipos celulares conocidos<sup>97,98</sup>. La estructura de FAK (Figura 6), está compuesta de un dominio corto central catalítico con actividad de cinasa, flanqueado por dos extremos largos (-N y -C) terminales<sup>99</sup> (Figura 6).



**Figura 6.** Estructura y sitios de fosforilación de la cinasa de adhesión focal. Figura tomada y modificada de<sup>99</sup>.

El extremo -N terminal de FAK, también denominado dominio FERM, debido a su homología de secuencia con la familia de proteínas asociadas al citoesqueleto de banda 4.1, denominada familia ERM (ezrina, radixina, moesina)<sup>100</sup>, media la interacción de FAK con las regiones citoplasmáticas de distintas proteínas transmembranales como: el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de

crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) <sup>101</sup> y principalmente con los dominios intracelulares de los receptores de integrinas <sup>99</sup>. La unión de FAK con los receptores de integrinas promueve la activación de distintas cinasas citoplasmáticas, por ejemplo, la cinasa de tirosina ETK, que se ha visto es importante en la vía de señalización de la fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K) y la cinasa Src <sup>102</sup>. Asimismo, mediante su dominio FERM, FAK es capaz de interactuar con la ezrina, una proteína adaptadora asociada al citoesqueleto de actina <sup>103</sup>. En este mismo dominio FERM, se ha demostrado la presencia de secuencias de importación (NLS) y exportación (NES) nuclear, que tras la unión de un grupo SUMO, inducen el movimiento de FAK al núcleo <sup>104</sup>. Asimismo, se ha visto que el dominio FERM actúa también como un inhibidor intramolecular de FAK, ya que es capaz de interactuar con el dominio catalítico de la proteína y bloquear su actividad. Por lo tanto, la integridad estructural y funcional del dominio FERM de FAK es esencial para que FAK se localice subcelularmente en las FA y desempeñe su actividad catalítica <sup>105</sup>.

Hay que mencionar, además que FAK posee tres regiones ricas en prolina (PRR1-3) dispuestas a lo largo de su estructura que funcionan como sitios de unión para proteínas que contengan dominios de homología 3 a la cinasa de Src (SH3). También, a través de estas regiones, se ha visto que FAK es capaz de asociarse con la proteína adaptadora p130Cas, de la que se sabe, es capaz de activar a Rac una proteína con actividad GTPasa, e inducir la formación de lamelipodios y posteriormente la migración celular. Asimismo, se ha visto que a través de las PRRs, FAK puede interactuar con otras GTPasas como GRAF y ASAP1 relacionadas con el ensamble de las FA <sup>106</sup>.

Por otro lado, se encuentra el extremo -C terminal de FAK, también llamado, dominio FAT (del inglés: *focal adhesion targeting*). Este dominio, de  $\approx 100$  residuos, estructuralmente conformado por cuatro hélices  $\alpha$ , media también la interacción de FAK con los receptores de integrinas, pero de manera indirecta, debido a la capacidad del dominio para interactuar con diversas proteínas que conforman las FA como: paxilina <sup>103</sup>, vinculina <sup>107</sup>, Csk y otras cinasas de tirosina como Src <sup>108</sup>. Estas asociaciones se deben principalmente a la alta homología del dominio FAT de FAK con dominios específicos de las ya mencionadas proteínas. Sin embargo, se desconoce si existe un orden específico para que FAK interactúe con las diversas proteínas que conforman las FA o si aún falta por identificar otras proteínas con las que se asocie <sup>109</sup>.

Asimismo, se sabe que a través del dominio FAT, FAK puede interactuar con GRB2 una proteína adaptadora para receptores de factores de crecimiento. La asociación GRB2 con FAK, conduce a la activación de Ras y a su vez a la activación de la vía de las MAPK, en donde se activa a la cinasa ERK1/2, lo que consecuentemente activa a la proteína de la cadena ligera de la miosina (MLK) ocasionando modulaciones en la dinámica de las FA y provocando la migración celular <sup>101,110</sup>. Por estas razones, el dominio FAT también es responsable de la correcta localización subcelular de FAK.

Por otro lado, el dominio FAT también es blanco para la unión de péptidos llamados FRNK (del inglés, *FAK-related-non-kinase*), estos péptidos se sintetizan de manera independiente a FAK y su principal función es regular negativamente su actividad de cinasa <sup>111</sup>. En muchos tipos celulares, la sobreexpresión de péptidos FRNK inhibe la migración celular, así como, la vía de señalización de las cinasas de proteína activadas

por mitógenos (MAPK) <sup>112,113</sup>. Asimismo, se sabe que la proteína FIP200, también se une a FAK y regula negativamente su actividad de cinasa al unirse con su dominio central catalítico <sup>114</sup>, del que hablaremos a continuación.

El dominio central catalítico, es la región a través de la que FAK ejerce su función de cinasa sobre proteínas substrato de las FA y a su vez es donde se localizan los residuos de tirosina (Tyr397, Tyr576 y Tyr577) fundamentales para iniciar y mantener su actividad <sup>99</sup>. Una peculiaridad del dominio central de FAK es que posee un puente disulfuro, esta es una característica que se considera atípica en cinasas citoplasmáticas, sin embargo, se ha visto que es de suma importancia para que FAK pueda activarse <sup>115</sup>, dado que es en el puente disulfuro donde se encuentra el residuo Tyr397, cuya autofosforilación es imprescindible para el inicio de la actividad de FAK<sup>116</sup>. Dicha autofosforilación puede ocurrir molecularmente de manera *cis* o *trans* <sup>117</sup> en las FA, sin embargo, se ha observado incrementos en su fosforilación cuando se estimulan receptores para factores de crecimiento, GPCRs y también por estímulos mecánicos <sup>109,116,118</sup>.

La autofosforilación del residuo Tyr397 de FAK, ocasiona la exposición de un sitio de unión para proteínas que contengan dominios SH2. Entre las proteínas que se une a FAK a través de este motivo están varias cinasas de la familia Src (SFKs), la fosfolipasa C- $\gamma$  (PLC $\gamma$ ), la proteína supresora de la señalización por citocinas (SOCS), la proteína 7 de unión a receptores de crecimiento (Grb7), la proteína adaptadora de receptores de integrina (Shc) y la subunidad p85 de la fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K) <sup>99</sup>, así como, distintas proteínas de adhesión que conforman las FA <sup>119,120</sup>. Sin embargo, se

desconoce si estas diferentes moléculas se unen comunmente a FAK o como consecuencia de estímulos celulares particulares <sup>99</sup>.

Aunque se ha reportado que distintas proteínas son las que se unen a FAK tras la fosforilación de su residuo Tyr397, distintos estudios demuestran que la asociación de FAK con Src es particularmente importante, ya que su inhibición impide muchos de los efectos celulares de FAK, como la migración celular. La formación del complejo Src-FAK, en primera instancia, promueve la activación conformacional de más moléculas de Src <sup>106</sup> y posteriormente la fosforilación de los residuos de Tyr576/577, presentes en el dominio central catalítico de FAK, hecho que ocasiona que FAK adquiera su máxima actividad catalítica <sup>93,99,121</sup>. Una vez que FAK ha alcanzado su máxima actividad catalítica, fosforila a diversas proteínas asociadas y no asociadas con las FA. Dos de las proteínas mejor caracterizadas como sustratos del complejo FAK-Src, son las proteínas p130Cas y paxilina. La fosforilación de p130Cas ocasiona un incremento en la tensión de membrana, la formación de lamelipodios y consecuentemente el inicio de la migración celular. Por su parte, la fosforilación de los residuos Tyr31 y Tyr118 de paxilina, promueve la desestabilización de la proteína, una reducción en su tiempo de vida media y su consecuente salida de las FA <sup>99,116</sup>. Asimismo, se ha visto que mutaciones en los residuos Tyr de Paxilina fosforilados por FAK inhiben el recambio de las FA y la migración celular <sup>122</sup>. En resumen, debido a la multiplicidad de asociaciones proteicas de FAK, particularmente para formar el complejo de señalización FAK-Src es que se considera a FAK como una reguladora maestra de la dinámica del citoesqueleto de actina, en la regulación de las FA y de la migración celular.

## **2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La cinasa de adhesión focal (FAK) es una cinasa de tirosina citoplásmica, descrita inicialmente como el sustrato preferente de la cinasa Src, en conjunto FAK-Src, media señales intracelulares involucradas en la regulación de funciones dependientes de la adhesión, como la migración y la proliferación celular, por lo que se ha propuesto su relación con distintas patologías como el cáncer. Particularmente, su función en patologías oculares proliferativas como la VRP, que incluye la transformación epitelio-mesénquima (TEM), proliferación y migración de las células del EPR, no se ha aclarado. Trabajos previos ha demostrado que la estimulación de las células del EPR por la trombina promueve la proliferación celular, la formación de fibras de tensión de actina y la migración, procesos centrales en el desarrollo de la VRP. Por lo tanto, el presente proyecto se enfoca en investigar el efecto de la trombina sobre la activación de FAK, las vías de señalamiento intracelular involucradas en dicha activación, la repercusión de la activación de FAK sobre las adhesiones focales y el efecto sobre la migración de las células del EPR de rata en cultivo.

### **3. HIPÓTESIS**

La trombina induce la activación de FAK y promueve la migración de las células del ERP .

### **4. OBJETIVO GENERAL.**

Investigar el efecto de la trombina sobre la activación de FAK, las vías de señalamiento intracelular involucradas en dicha activación, la repercusión de la activación de FAK sobre las adhesiones focales y el efecto sobre la movilidad de las células del EPR de rata en cultivo.

#### **4.1 OBJETIVOS PARTICULARES.**

- I.** Demostrar la activación de FAK por trombina en células del EPR de rata en cultivo.
- II.** Identificar las vías de señalización intracelular involucradas en la activación de FAK inducida por trombina.
- III.** Determinar la participación de FAK en la remodelación de las adhesiones focales y en la migración de células del EPR de rata estimuladas con trombina.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 REACTIVOS UTILIZADOS

La trombina, la hirudina, el péptido agonista para el PAR-1 (Ser- Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-Pro-Asn-Asp-Lys-Tyr-Glu-Pro-Phe), el pseudosustrato inhibidor de la PKC- $\zeta$  (Myr-Ser-Ile-Tyr-Arg-Arg-Gly-Ala-Arg-Arg-Trp-Arg-Lys-Leu), el inhibidor de las n/cPKC, Ro-32-0432 y el inhibidor de la ROCK, Y-27632, se obtuvieron de Calbiochem. El medio de cultivo Opti-MEM, el suero fetal de bovino (SFB), el medio de cultivo DMEM-F12, la dispasa y los antibióticos penicilina-estreptomicina se obtuvieron de Gibco. El cóctel de inhibidores de proteasas (P8340), la tripsina, el inhibidor de la PI3K, Wortmanina, el fármaco inhibidor de las n/cPKC, estaurosporina, el kit de ácido bicinconínico (BCA) para la determinación de proteínas y la Mitomicina C se adquirieron de Sigma Chemical Co. El Trizol, la transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV-RT), el inhibidor de RNAasas (RNase out), la polimerasa Taq recombinante y la lipofectamina® RNAi-MAX se adquirieron de Invitrogen. El péptido agonista para el PAR-3 (Ser-Phe-Asn-Gly-Gly-Pro) y el péptido agonista para PAR-4 (Gly-Tyr-Pro-Gly-Lys-Phe) se adquirieron de Bachem. La proteína G sefarosa se obtuvo de Amersham biosciences. El reactivo Cell Titer 96® Aqueous One Solution Reagent para determinar la viabilidad celular se obtuvo de Promega. Finalmente, la colágena tipo IV se adquirió de Santa Cruz.

Los anticuerpos monoclonales de conejo anti-foso-FAK (Y576/577), anti-Vinculina, anti-Paxilina y anti-GAPDH se obtuvieron de Cell Signaling Technology. El anticuerpo monoclonal de ratón anti-FAKH1 se adquirió de Santa Cruz, mientras que el anticuerpo monoclonal de ratón anti-Actina se obtuvo de Millpore. Finalmente, los



anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo y anti-IgG de ratón conjugados con la enzima HRP se compraron de Cell Signaling Technology.

## **5.2 CULTIVO PRIMARIO DEL EPR DE RATA**

Las células del EPR se aislaron de ratas Long Evans de 8-10 días de edad, como se describe en <sup>123</sup>. Brevemente, los ojos se extrajeron y se incubaron durante 10 minutos a 37 °C en medio de cultivo DMEM F12 al 10% <sup>v/v</sup> de suero fetal bovino (SFB), suplementado al 1% de penicilina/estreptomicina. Posteriormente, los ojos se incubaron durante 30 minutos a 37 °C en una solución al 1% <sup>m/v</sup> de dispasa en medio de cultivo DMEM F12. Inmediatamente después de la incubación, se retiró la esclerótica, la coroides y demás tejido adyacente de cada ojo. En seguida, se realizó un corte coronal a cada ojo para retirar la córnea, el cristalino y el vítreo. La parte posterior recuperada de cada ojo, se incubó durante 30 minutos a 37 °C en solución Hank libre de Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> (5.4 mM KCl, 0.3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4.2 mM NaHCO<sub>3</sub>, 137 mM NaCl, 5.6 mM D-glucosa, 0.01 % rojo fenol; pH 7.4). Posteriormente, las células del EPR se disociaron mecánicamente de la parte posterior y se incubaron durante 3 minutos a 37 °C en tripsina al 0.1% <sup>m/v</sup>. La digestión de la tripsina se detuvo al agregar medio de cultivo Opti-MEM al 4% <sup>v/v</sup> de SFB. Finalmente, las células se concentraron mediante centrifugación, se homogenizaron en Opti-MEM al 4%<sup>v/v</sup> de SFB y se sembraron a una densidad de 1x10<sup>5</sup> células/cm<sup>2</sup> en cajas de cultivo de 12 pozos recubiertas previamente con 10 µg/cm<sup>2</sup> de colágena tipo IV, siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de aproximadamente 4 días en cultivo, las células se privaron de SFB durante 24 horas previo al tratamiento correspondiente.

### 5.3 INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS

Los lisados celulares se obtuvieron con el buffer: 20 mM Tris-HCl; pH 8.0, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, 10% Glicerol. Las proteínas recuperadas se cuantificaron mediante el método del ácido bicinonínico (BCA), se solubilizaron en buffer de Laemmli (0.75 mM Tris-HCl; pH 8.8, 5% SDS, 20% glicerol y 0.01% azul de bromofenol) y se calentaron durante 5 minutos a 60 °C, únicamente 10 µg de lisado total de proteínas se resolvieron por SDS-PAGE en geles de acrilamida al 7.5%, después las proteínas se electro transfirieron a membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF). Posteriormente las membranas de PVDF se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente en buffer TBS (100 mM Tris-HCl; PH 7.5, 2.5 M NaCl) al 5% <sup>m/v</sup> de leche sin grasa Finalmente las membranas de PVDF se incubaron con los anticuerpos específicos; α-fosfo-FAK (Y576/Y577) (1:1000), α-FAK (1:1500), o α-GAPDH (1:5000), durante toda la noche a 4°C. Los anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo (1:1000) o anti-IgG de ratón (1:1000) conjugados con la enzima HRP se incubaron durante 2 horas a 4°C. La reacción de quimioluminiscencia se logró usando el reactivo Luminata™ Forte Western HRP Substrate (Millipore). La quimioluminiscencia se grabó en Kodak® X-ray films, los films se digitalizaron utilizando el sistema Alpha Digi-Doc (Alpho-Innotech) y los análisis densitométricos se realizaron con el programa ImageJ (1.47v). El resultado se expresó en una relación de fosfo-FAK (576/577) en proporción a la cantidad total de FAK. El basal de la fosforilación de fosfo-FAK (576/577) de las células no estimuladas se estableció como el 100% o control, excepto cuando se experimentó con los inhibidores farmacológicos: Ro-32-0432, Wortmanina, Y-27632 o el pseudosustrato inhibidor de la PKC-ζ, en

donde la fosforilación de fosfo-FAK (576/577) de los cultivos estimulados con trombina se estableció como el 100% o control.

#### **5.4 VIABILIDAD CELULAR**

La viabilidad celular se determinó mediante el método colorimétrico de reducción de MTS [(3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) -5 - (3 - carboxymethoxyphenyl) -2 - (4-sulfofenil)-2H-tetrazolio] con el kit Cell Titer 96® Aqueous One Solution Reagent, Promega. Para esto, las células del EPR de rata, se sembraron a una densidad de  $1.5 \times 10^3$ , en cajas de 96 pozos recubiertas con colágena IV  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , posteriormente se privaron de SFB durante 24 horas previo a la incubación con los inhibidores farmacológicos: Ro-32-0432, Wortmanina, Y-27632 o el pseudosustrato inhibidor de la PKC- $\zeta$ . Al terminar la incubación y siguiendo las instrucciones del fabricante, se incubó el MTS durante 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$ . Finalmente se midió la absorbancia de la reacción colorimétrica a 490 nm.

#### **5.5 PCR DE FAK**

Para determinar la expresión del gen de FAK cuando las células del EPR de rata se incubaron en presencia del pseudosustrato inhibidor de la PKC- $\zeta$ , se utilizó la técnica semicuantitativa de RT-PCR. Brevemente, se aisló el ARN total de cultivos celulares del EPR de rata en confluencia, utilizando Trizol, siguiendo las instrucciones del fabricante, posteriormente se realizó una retro transcripción (RT) del ARN mensajero, usando  $1 \mu\text{g}$  del RNA total, 20 U de la transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV-RT), 1 U del inhibidor de RNAsas (RNAaseout), 0.2 U de

RNAse H y 0.25 mg de oligo dT en el buffer recomendado por el fabricante (50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM ditioneio, DTT). En la retro transcripción las muestras se sometieron por 10 minutos a 80 °C, 60 minutos a 42 °C y 15 minutos a 75 °C. Posteriormente 5 µl del ADNc se utilizaron como sustrato para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los oligonucleótidos específicos para FAK (5'-CTGTACTTCCGACAGCGTGA-3' y 5'-ATGTCGTGAGCGCATAGACC-3') y para β-actina (5'-GCTCGTCGTCGACAACGGCT-3' y 5'-CAAACATGATCTGGGTCATCTTCTC-3') se utilizaron a 0.4 mM en cada reacción, la que además contenía, 2.5 U de polimerasa (Taq recombinante), 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). Durante la PCR las muestras se sometieron a 94 °C por 5 minutos y, posteriormente, a 26 y 22 ciclos para FAK y para β-actina respectivamente, con el protocolo siguiente: 94 °C durante 30 segundos, 59 °C durante 30 segundos, y 72 °C durante 45 segundos. El análisis densitométrico se realizó utilizando el programa ImageJ (1.47V). La amplificación de β-actina se utilizó como control de carga; la expresión del gen de FAK se normalizó con la expresión del gen de β-actina en la misma muestra y se expresó en porcentaje con respecto al control negativo (nivel basal de expresión).

## **5.6 SILENCIAMIENTO DE FAK**

Se logró utilizando el RNA de interferencia (siRNA) para FAK, adquirido de Sigma Chemical Co (SASI\_Rn02\_00260847). La transfección transitoria del siRNA para FAK (20 nM), se realizó empleando lipofectamina RNAiMAX en medio Opti-MEM al 4%<sup>V/V</sup> de SFB sin antibióticos (penicilina-estreptomicina) durante 24 horas. La depleción de

FAK se confirmó mediante Western blot, en donde los cultivos celulares tratados solamente con lipofectamina se establecieron como el 100% o control.

## **5.7 ENSAYO DE MIGRACIÓN CELULAR**

Para evaluar la migración de las células del EPR se realizó un ensayo de reparación de herida (Wound healing). Para ello, as células del EPR de rata, se sembraron a  $2.5 \times 10^5$  células por pozo en cajas de 6 pozos recubiertos con  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  de colágena tipo IV. Cuando los cultivos celulares estaban a 50-60% de confluencia, se realizó una transfección transitoria con el siRNA de FAK, como se describe previamente. Al finalizar el tiempo de transfección, los cultivos celulares del EPR de rata, se privaron de SFB durante 24 horas. Posteriormente los cultivos celulares, se incubaron durante 30 minutos en presencia de Mitomicina C ( $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ). Al término de la incubación, se utilizó una punta de  $200 \mu\text{l}$  estéril para hacer una herida en los cultivos celulares. Para remover las células desprendidas producto de la herida, los cultivos celulares se lavaron con 1 ml de Opti-MEM libre de suero fetal de bovino. Posteriormente, se estimuló a los cultivos celulares durante 24 horas con trombina ( $2\text{U}/\text{ml}$ ), o SFB  $4\% \text{v/v}$ . Finalmente los cultivos celulares se fijaron durante 30 min a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  con paraformaldehído (PFA) al  $4\% \text{m/v}$  y se tiñeron con cristal violeta ( $0.1\% \text{v/v}$ ). Las imágenes de la migración celular inducida por la trombina y el SFB, se obtuvieron con un microscopio invertido Nikon Eclipse TS100 y una cámara Coolpix 4300. El índice de migración se estableció a través del conteo de células presentes en la herida de los cultivos estimulados con trombina, o SFB durante 24 horas, sobre la cantidad de células migrantes de cultivos celulares sin estímulo.

## 5.8 INMUNOPRECIPITACIÓN DE FAK

Para los ensayos de inmunoprecipitación, los lisados celulares se obtuvieron con el buffer TNTE (50 mM Tris-HCl; pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA y 0.5% Triton X-100). La concentración de las proteínas recuperadas se determinó mediante el método BCA. Únicamente 700 µg del lisado total de proteínas se incubaron durante una noche a 4° C en presencia de perlas de sefarosa-proteína G acopladas con 1 µg de anti-FAK. Posteriormente, las perlas de sefarosa-proteína G se recuperaron por centrifugación a 1000 rpm durante 1 minuto. El inmunoprecipitado se solubilizó en 60 µl de buffer de Laemmli (0.75 mM Tris- HCl; pH 8.8, 5% SDS, 20% glicerol y 0.01% azul de bromofenol) y se calentó durante 10 minutos a 80 °C. Solamente 20 µl del solubilizado se resolvió mediante SDS-PAGE en geles al 7.5% de acrilamida, después las proteínas se electro-transfirieron a membranas de PVDF. Finalmente, las membranas de PVDF se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente en buffer TBS (100 mM Tris-HCl; PH 7.5, 2.5 M NaCl) al 5% de leche sin grasa. Finalmente, las membranas de PVDF se incubaron con los anticuerpos específicos;  $\alpha$ -FAK (1:1500),  $\alpha$ -Vinculina (1:1000) o  $\alpha$ -Paxilina (1:1000) durante toda la noche a 4°C. Los anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo (1:1000) o anti-IgG de ratón (1:1000) conjugados con la enzima HRP se incubaron durante 2 horas a 4°C. La reacción de quimioluminiscencia se logró usando el reactivo Luminata™ Forte Western HRP Substrate (Millipore). La quimioluminiscencia se grabó en Kodak® X-ray films, los films se digitalizaron utilizando el sistema Alpha Digi-Doc (Alpho-Innotech) y los análisis densitométricos se realizaron utilizando el programa ImageJ (1.47v). El resultado se expresó en una relación de asociación entre la cantidad total de FAK y la

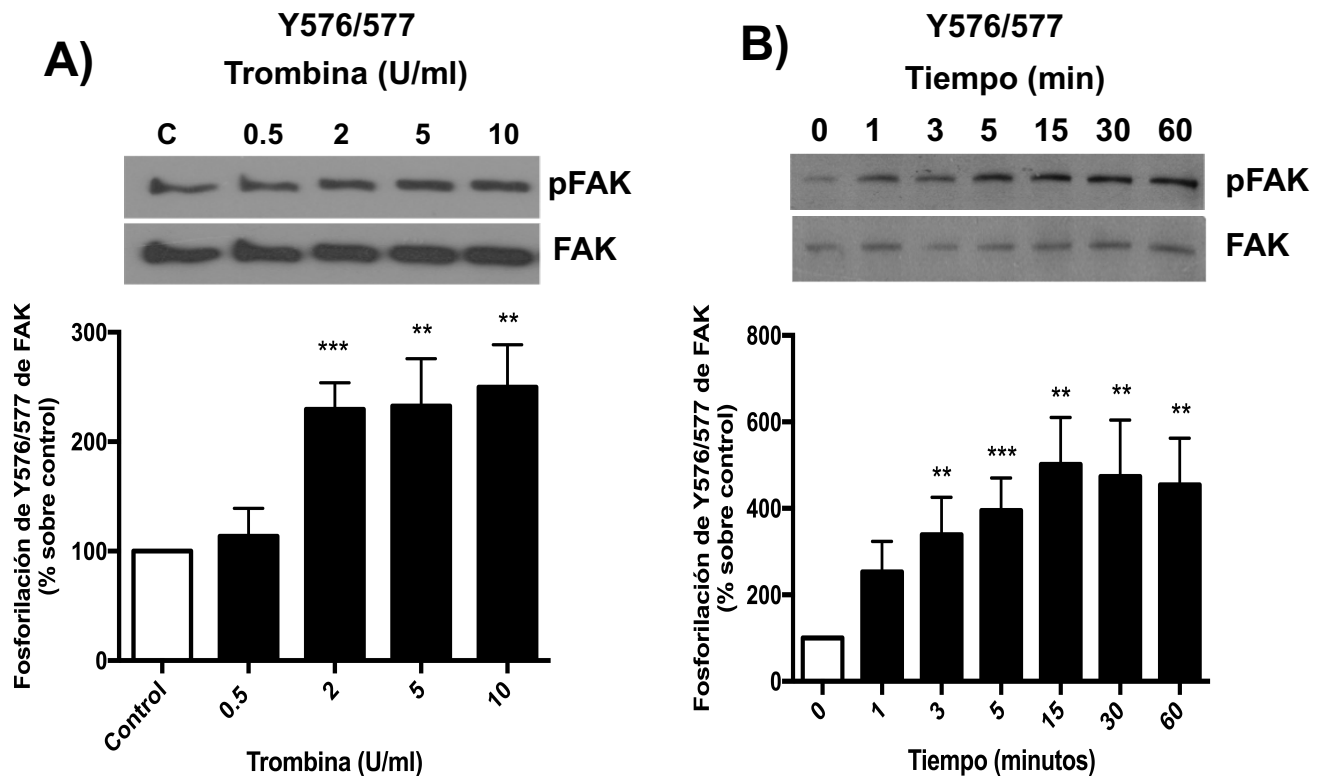
cantidad total de vinculina o paxilina. El basal de la asociación de FAK con vinculina o paxilina de las células no estimuladas se estableció como el 100% o control.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 LA TROMBINA ESTIMULA LA FOSFORILACIÓN DE Y576/577 DE FAK

Con el fin de demostrar el papel de FAK en la participación de la migración de células del EPR de rata tras la estimulación con trombina, se incluyó la trombina en cultivos confluentes de células del EPR. Dado que la fosforilación de los residuos de Y576/577, presentes en el dominio catalítico de FAK se considera un evento esencial para que la cinasa adquiera su máxima actividad catalítica <sup>99,109</sup>, primero se analizó la capacidad de la trombina para inducir la fosforilación de dichos residuos en las células del EPR sembradas sobre una matriz de colágena IV (10 µg/cm<sup>2</sup>). La fosforilación de Y576/577, requerida para alcanzar la actividad catalítica completa de FAK, demostró ser dosis-dependiente a una concentración máxima de 2U/ml de trombina (**Figura 1A**). Por otro lado, la fosforilación de Y576/577 aumenta con relación al tiempo de exposición a la trombina alcanzando un aumento significativo a partir de los 3 minutos el cual se sostuvo hasta los 60 minutos (**Figura 1B**).

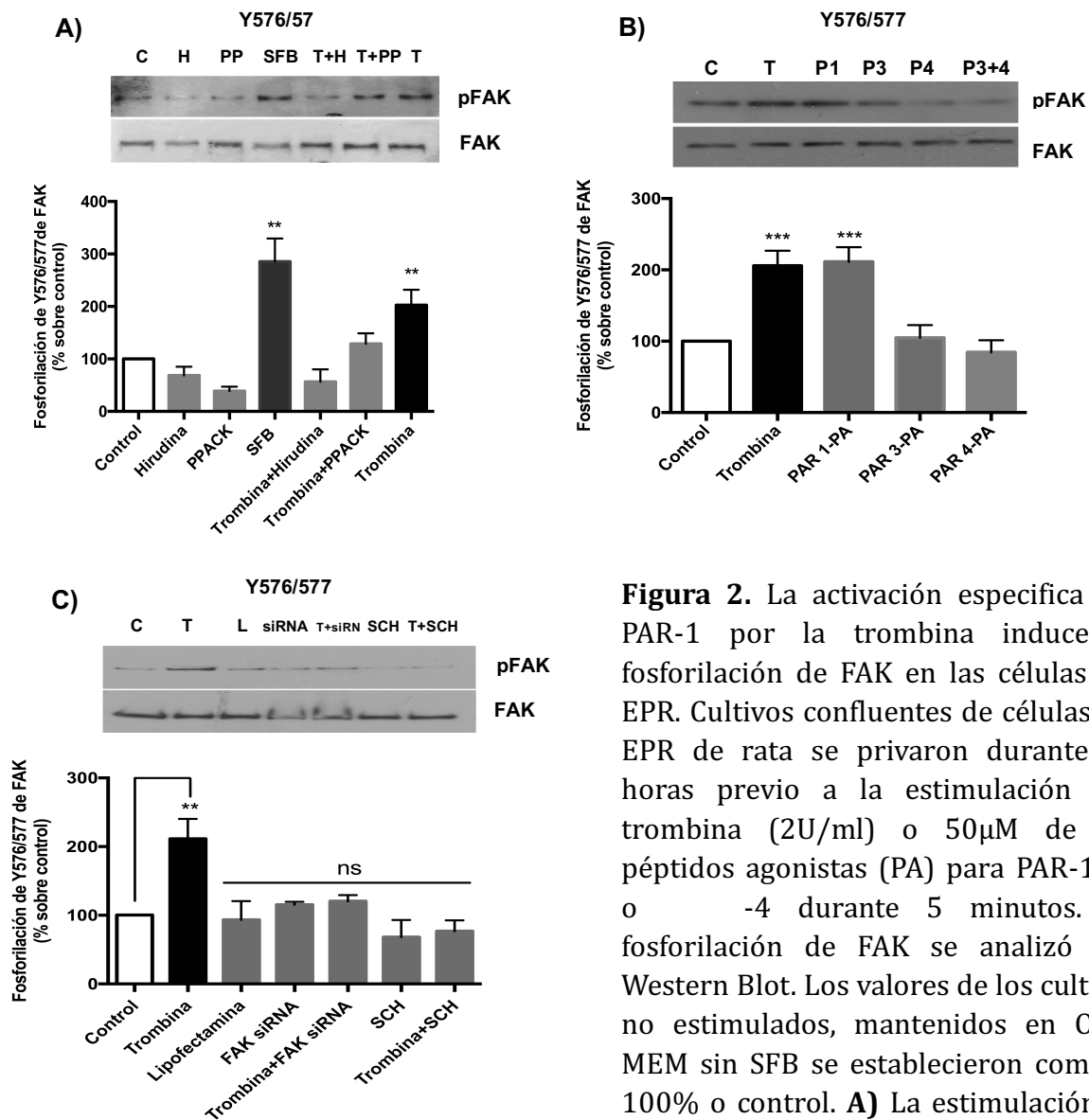




**Figura 1.** La trombina estimula la fosforilación de Y576/577 en células del EPR. Los cultivos primarios del EPR de rata se privaron de SFB durante 24 horas previo a la estimulación con 2U/ml de trombina. La fosforilación de FAK se analizó por ensayos de *Western blot* como se describe en materiales y métodos. **(A)** La fosforilación de los residuos de Y576/577 es dosis dependiente y los niveles máximos se observaron mediante la adición de 2 U/ml de trombina. **(B)** La trombina promueve la estimulación desde los 5 minutos y se sostiene hasta los 60 minutos. Los valores de los cultivos no estimulados, mantenidos en Opti-MEM sin SFB se establecieron como el 100% o control. Los datos se normalizaron con la expresión relativa de FAK total. Los datos se expresaron como la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes en donde sí. \*\*p < 0.05, \*\*\*p < 0.001 por Prueba t de Student, comparando en contra del control.

## 6.2 LA TROMBINA INDUCE LA FOSFORILACIÓN DE Y576/577 A TRAVÉS DE LA ACTIVACIÓN DE PAR-1

La especificidad de la estimulación con trombina (2U/ml) sobre la fosforilación de Y576/577 de FAK se determinó en cultivos confluentes de células del EPR, sembradas sobre una matriz de colágena IV (10µg/cm<sup>2</sup>). Como se demuestra en la **Figura 2A**, la fosforilación de FAK se evitó al coincubar durante 30 min. a la trombina con hirudina (4U/ml), un quelante de la trombina o, con el péptido sintético, PPACK (25µM), inhibidor del sitio catalítico de la trombina. Así mismo, para demostrar que el efecto de la trombina se produce por la activación de los receptores activados por proteasas (PAR), e identificar el receptor responsable de la inducción de la fosforilación de FAK por trombina, cultivos celulares confluentes de células del EPR se estimularon con péptidos agonistas (PA) específicos para PAR-1, PAR-3 y PAR-4. Los resultados de la **Figura 2B**, demuestran que solamente el péptido agonista para PAR-1 estimula la fosforilación de FAK en la misma medida que la trombina, mientras que la estimulación con los péptidos agonistas para PAR-3 o PAR-4 no tuvieron efecto. Adicionalmente para confirmar que el efecto de la trombina es a través de PAR-1, cultivos confluentes de células del EPR se incubaron durante 30 min en presencia de SCH79797 (30µM), un inhibidor específico de PAR-1, previo a la estimulación con 2U/ml de trombina. Los resultados en la **Figura 2C** demuestran que la fosforilación de FAK inducida por la trombina se suprime mediante la inhibición de PAR-1 con el fármaco SCH79797, así como por la supresión de la expresión de FAK por un siRNA específico. En conjunto estos resultados demuestran que la inducción de la fosforilación/activación de FAK inducida por la trombina se produce por la activación de PAR-1.

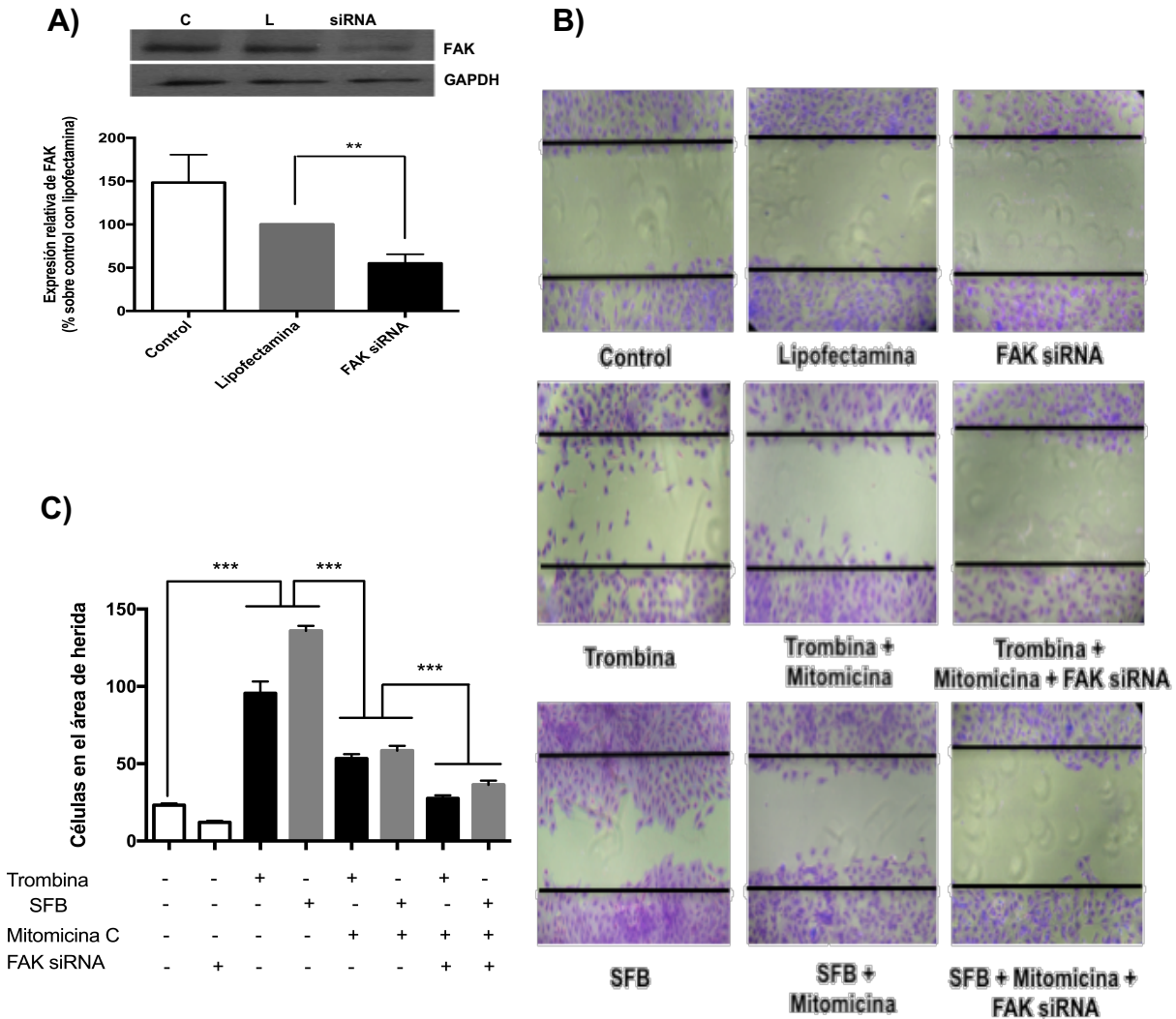


**Figura 2.** La activación específica del PAR-1 por la trombina induce la fosforilación de FAK en las células del EPR. Cultivos confluentes de células del EPR de rata se privaron durante 24 horas previo a la estimulación con trombina (2U/ml) o 50µM de los péptidos agonistas (PA) para PAR-1, -3 o -4 durante 5 minutos. La fosforilación de FAK se analizó por Western Blot. Los valores de los cultivos no estimulados, mantenidos en Opti-MEM sin SFB se establecieron como el 100% o control. **A)** La estimulación de los residuos de tirosina 576/577 se

previno al pre incubar los cultivos celulares del EPR con el quelante de la trombina, la Hirudina (H) (4U/ml), o con el péptido sintético inhibidor del sitio catalítico de la trombina, PPACK (PP) (25µM) durante 30 minutos antes de la estimulación con trombina. SFB se utilizó como control positivo. **(B)** El péptido agonista para PAR-1 imito el efecto de la trombina a diferencia de los péptidos agonistas para PAR-3 y -4 que no tuvieron efecto. **(C)** La fosforilación de FAK inducida por la trombina se previno al pre incubar a las células del EPR durante 30 minutos con el fármaco inhibidor de PAR-1 SCH79797 (30µM), de igual modo, el efecto de la trombina sobre la fosforilación de FAK se suprimió al transfectar a las células del EPR con un siRNA para FAK previo a la estimulación con trombina. Los datos se expresaron como la media ± SEM de tres experimentos independientes en donde sí. \*p < 0.01, \*\*p < 0.05, \*\*\*p < 0.001 por Prueba t de Student, comparando en contra del control

### 6.3 LA MIGRACIÓN DE LAS CÉLULAS DEL EPR INDUCIDA POR TROMBINA REQUIERE LA EXPRESIÓN DE FAK

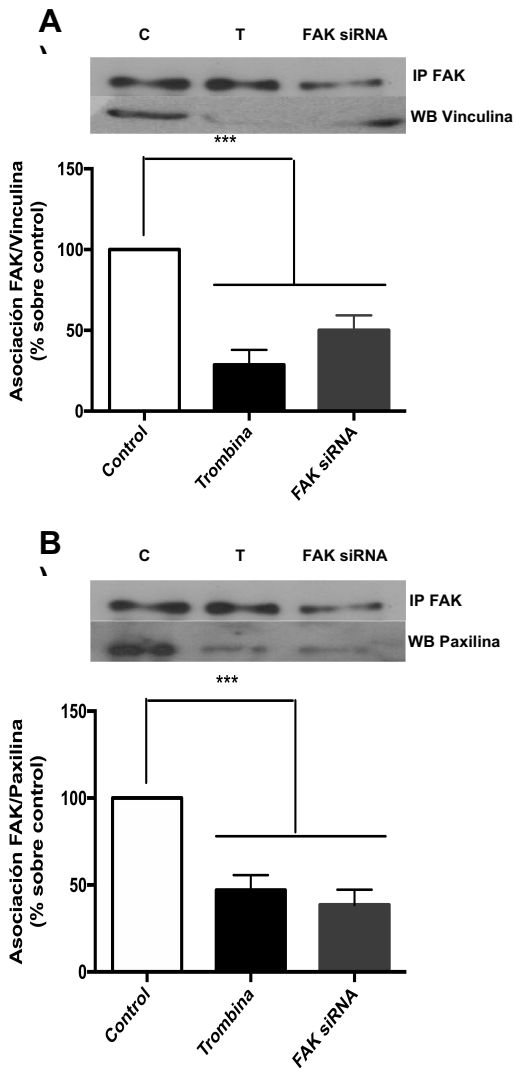
Evidencia considerable ha demostrado que FAK es esencial para la transducción de señales que induce el recambio de las FA en células migrantes, a pesar de esta evidencia <sup>94,99,124,125</sup>, la participación de FAK en la migración de células del EPR inducida por la trombina no se ha estudiado. Con el fin de abordar esta cuestión, se analizó la migración de células del EPR en un ensayo de *Wound healing* en donde se comparó la migración de células control y de células transfectadas con un siRNA para FAK y estimuladas con 2U/ml de trombina o 4% de SFB (control positivo) (**Figura 3**). Los resultados demuestran que la trombina y el SFB promueven la migración de las células del EPR hacia adentro del área de herida, esta respuesta se abolió por la supresión de la expresión de FAK inducida por el siRNA (**Figura 3A y B**). Dado que el cierre de la herida además de la migración, involucra proliferación celular, los experimentos se realizaron en presencia de mitomicina C (1µg/ml), un inhibidor de la síntesis de DNA. La inhibición de la proliferación celular en esta condición se midió utilizando el método de reducción de MTS (**Figura 2S Apéndice**.) El análisis gráfico de los resultados de la **Figura 3B** se representan en la **Figura 3C**. En conjunto estos resultados demuestran que FAK es esencial para la migración de las células del EPR inducida por trombina.



**Figura 3.** La expresión de FAK es esencial para que la trombina induzca la migración de las células del EPR. **(A)** El siRNA para FAK suprime la expresión de FAK ~50% a las 24 horas. **(B)** Cultivos celulares confluentes de EPR se privaron de SFB durante 24 horas previo a la estimulación con 2U/ml de trombina o SFB al 4% (control positivo). La migración celular se analizó utilizando ensayos de *Wound healing*. Mitomicina C (1µg/ml) se incluyó al medio de cultivo para descartar la contribución de proliferación en el cerrado de la herida. Los tratamientos con trombina o SFB promovieron la migración celular, sin embargo, la migración se abolió cuando se interfirió la síntesis de FAK. Los cultivos se fijaron, tiñeron y fotografiaron. **(C)** Representación gráfica de los datos obtenidos en **(B)**. Los resultados son la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes en donde sí. \* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$  por ANOVA de una vía, *post-hoc* Dunnett's.

#### **6.4 LA FOSFORILACIÓN DE Y576/577 INDUCIDA POR LA TROMBINA PROMUEVE EL DESENSAMBLE DE LAS ADHESIONES FOCALES**

Diversos estudios han demostrado que la fosforilación de FAK inducida a través de distintos estímulos conduce al recambio de las FA, evento que es necesario para promover el movimiento y migración celular <sup>93,124</sup>. La asociación de FAK con las proteínas estructurales paxilina y vinculina es necesaria para el mantenimiento de los complejos de adhesión focal que vinculan al citoesqueleto de actina con la MEC <sup>107</sup>. Para comprobar si la fosforilación de FAK inducida por la trombina resulta en el desensamble de las FA, se midió a través de ensayos de coimmunoprecipitación, la asociación de FAK con vinculina y paxilina en células del EPR estimuladas con trombina. Los resultados demuestran que la estimulación con trombina disminuye la asociación de FAK con vinculina (**Figura 4A**) y paxilina (**Figura 4B**) indicando una disociación de los complejos de FA.



**Figura 4.** La trombina promueve el desensamble de los complejos de adhesión focal a través de la fosforilación de FAK. Los cultivos primarios confluentes de células del EPR se privaron durante 24 horas previo a la estimulación con 2U/ml de trombina durante 5 minutos. La expresión de FAK se suprimió al transfectar a las células del EPR con un siRNA para FAK durante 24 horas. El efecto de la trombina sobre el desensamble de los complejos de adhesión focal se analizó a través de la pérdida de interacción entre FAK/Paxilina y FAK/Vinculina utilizando co-inmunoprecipitaciones. La exposición de las células del EPR a la trombina abolió la interacción de FAK con Vinculina **(A)** y paxilina **(B)**. La supresión de FAK con el siRNA induce la disociación de FAK con Vinculina y Paxilina, indicando que la trombina induce el desensamble a través de la activación de FAK. La asociación en los cultivos celulares no estimulados se establecieron como el 100% o control. Los resultados son la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independiente. \* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$  por ANOVA de una vía, *post-hoc* Dunnett's.

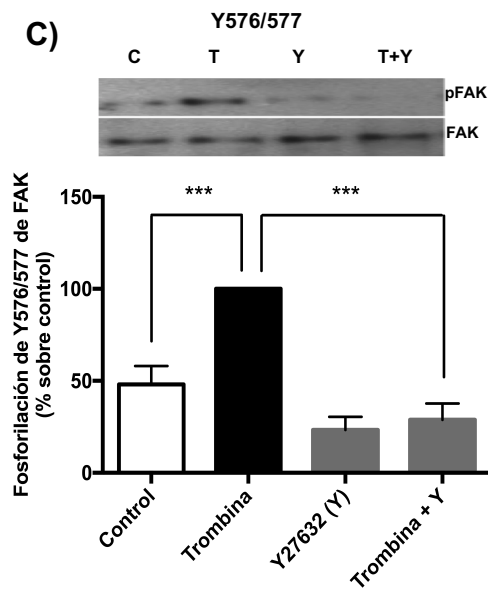
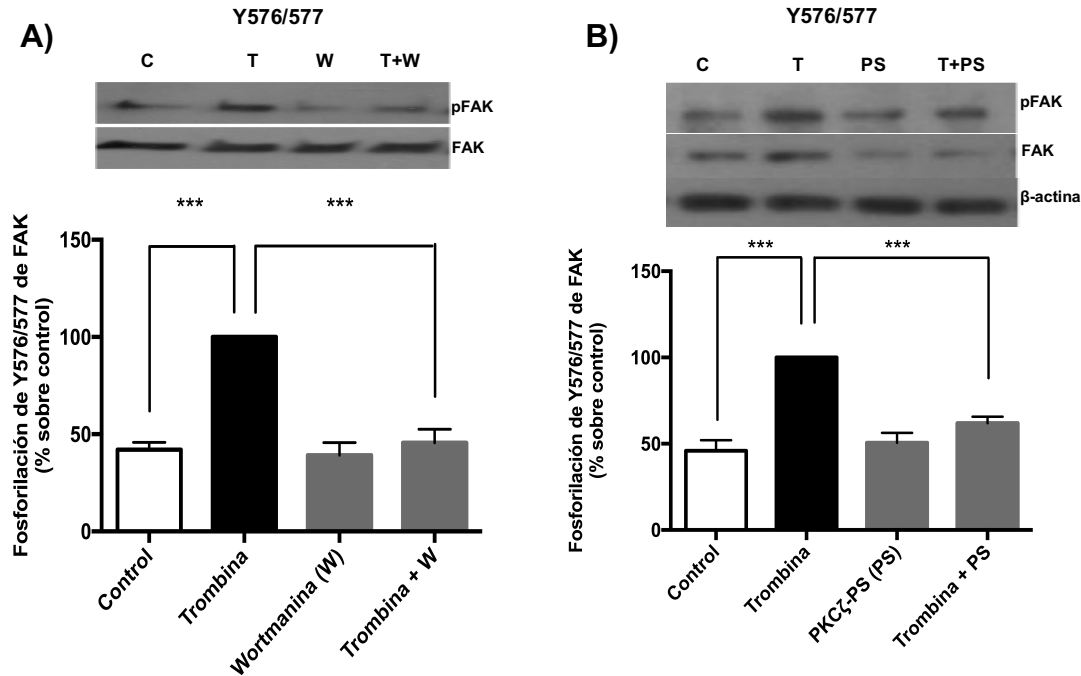
## 6.5 LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN PI3K/PKCζ INDUCIDA POR LA TROMBINA MEDIA LA FOSFORILACIÓN DE Y576/577 DE FAK

Después de la activación proteolítica del PAR-1, se desencadena eventos de señalización intracelular dependientes de proteínas G <sup>72</sup>, que a su vez activan a la PI3K, un importante activador de la isoforma atípica de la familia de la PKC (PKCζ) <sup>126</sup>. En trabajos anteriores se ha demostrado la participación de PI3K/PKCζ en la migración de células del EPR inducida por la trombina <sup>60</sup>. Con el fin de dilucidar el mecanismo de señalización implicado en la fosforilación de FAK, se investigó si este efecto se produce por la vía de señalización de PI3K/PKCζ. Con este fin se examinó el efecto de la inhibición de PI3K/PKCζ sobre la fosforilación Y576/577 de FAK inducido por la trombina. Como se muestra en la **Figura 5A**, la inhibición de PI3K con wortmanina evitó la fosforilación de los residuos Y576/577 de FAK estimulada por la trombina. Así mismo la inhibición de PKCζ por el péptido pseudosustrato miristoilado (ácido mirístico-Ser-Ile-Tyr-Arg-Arg-Gly-Ala-Arg-Arg-Trp-Arg-Lys-Leu) (PS- PKCζ) también evitó la fosforilación de Y576/577 de FAK (**Figura 5B**). Es de notarse que el tratamiento con el PS-PKCζ inhibe la fosforilación de FAK y también aparentemente disminuye la expresión de FAK total. Para descartar un efecto no específico del PS-PKCζ sobre la transcripción del gen de FAK (PTK2), se realizó una RT-PCR que demostró que el tratamiento con PS-PKCζ no afecta la expresión del gen de FAK. (**Figura 1S [B] Apéndice**).

Por otro lado, se ha demostrado que PAR-1 regula la activación de la vía de señalización Rho/ROCK <sup>61</sup>, ocasionando la remodelación del citoesqueleto, subyacente a los cambios en la forma celular, la motilidad y polarización <sup>127</sup>. Así mismo se ha



propuesto a PKC $\zeta$  como el efector río abajo de Rho/ROCK lo que induce la polimerización de actina <sup>127</sup> y a la migración celular <sup>128</sup>. Puesto que la inhibición de PKC $\zeta$ , previene la fosforilación de FAK inducida por la trombina (**Figura 5B**), se probó el efecto de la inhibición de Rho/ROCK sobre la fosforilación de FAK Y576/577 de FAK inducida por trombina. Los resultados de la **Figura 5C**, demuestran que la inhibición de ROCK por el inhibidor específico Y27632 impide completamente el efecto de la trombina sobre la fosforilación de FAK.

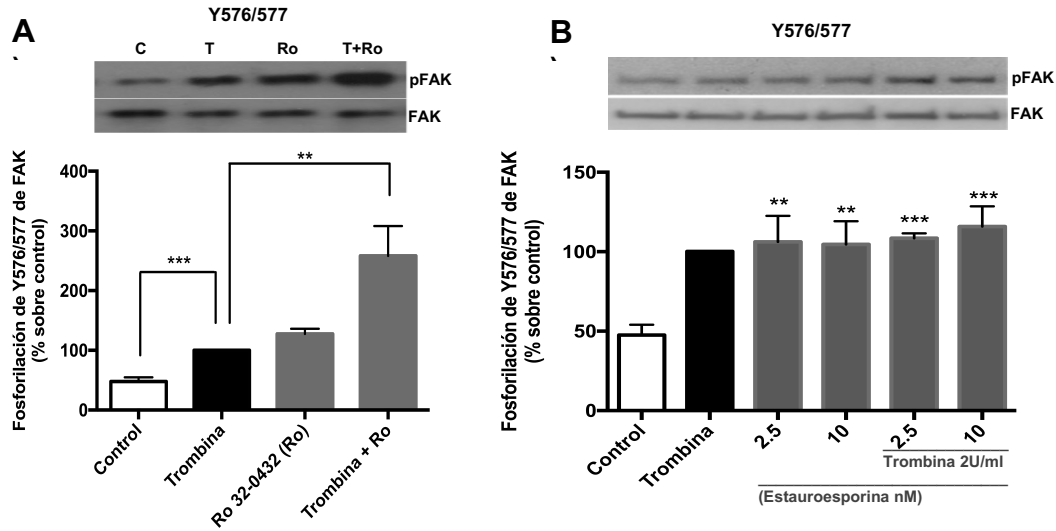


**Figura 5.** La estimulación con trombina de los residuos de tirosina 576/577 requiere la actividad de PI3K/PKC- $\zeta$ . Los cultivos celulares del EPR se privaron durante 24 horas previo a la incubación de los inhibidores específicos durante 20min. Posteriormente, los cultivos celulares se estimularon con 2U/ml de trombina durante 5 minutos. La fosforilación relativa de FAK se determinó mediante Western blot. La fosforilación de los residuos de tirosina 576/577 de FAK se midió en ausencia y presencia de: **(A)** 100nM del inhibidor farmacológico de PI3K, Wortmanina (W); **(B)** 10 $\mu$ M del péptido pseudosustrato miristoilado de PKC- $\zeta$  (PS), o **(C)** El fármaco inhibidor de Rho/ROCK, Y-27632 (10 $\mu$ M). Los resultados demuestran que la inhibición

de PI3K o de uno de sus blancos río abajo, la PKC- $\zeta$  previene completamente el efecto de la trombina. Asimismo, la activación de Rho/ROCK se requiere para inducir la fosforilación de los residuos 576/577 de FAK. Los valores de los cultivos estimulados con trombina se establecieron como el 100% o control. Los datos se expresaron como la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes en donde sí. \*p < 0.01, \*\*p < 0.05, \*\*\*p < 0.001 por Prueba t de Student, comparando en contra del control

## 6.6 LA INHIBICIÓN DE LAS ISOFORMAS C/N PKC INDUCEN LA HIPERFOFORILACIÓN DE LOS RESIDUOS Y576/577 DE FAK

El acoplamiento de PAR1 a los miembros de la familia  $G_q$  de las proteínas G resulta en la activación de la PLC- $\beta$  y consecuentemente de las isoformas de c/nPKC <sup>64</sup>. Trabajos previos han demostrado que la activación del PAR-1 por la trombina induce la señalización de PLC $\beta$ /c/nPKC en células del EPR <sup>129</sup>. Con el fin de analizar la posible contribución de las isoformas c/nPKC sobre la fosforilación de los residuos Y576/577 de FAK inducida por la trombina, se probó el efecto de la inhibición de las c/nPKC por la bisindolylmaleimida, Rho 32-0432 <sup>130</sup>. Inesperadamente, la fosforilación de FAK se incrementó de manera significativa tras la incubación con el inhibidor específico Ro 32-0432 (**Figura 6A**). Aunado a la estimulación de la fosforilación por el inhibidor de PKC, se observó un efecto sinérgico con la estimulación de la fosforilación de FAK inducida por la trombina. Para confirmar este resultado, se probó el efecto de otro inhibidor de las c/nPKC, estaurosporina. La **Figura 6B**, demuestra que la incubación con estaurosporina, promueve la fosforilación de FAK al mismo nivel que la trombina; sin embargo, la inclusión conjunta de la trombina y la estaurosporina no mostro una sinergia en el efecto de fosforilación de los residuos Y576/577 de FAK. Estos resultados sugieren que la estimulación de la fosforilación de FAK Y576/577 por Ro 32-0432 y la estaurosporina se logra a través de distintos mecanismos moleculares, lo que añade nueva información sobre la especificidad de los inhibidores de c/nPKC, relacionados posiblemente con el tipo celular examinado (EPR).



**Figura 6.** Inhibición de las isoformas nuevas y convencionales de la PKC induce la hiperfosforilación de los residuos de tirosina 576/577 de FAK. Cultivos confluentes de células del EPR se privaron de SFB durante 24 horas. **(A)** Posteriormente, las células se pre incubaron con el inhibidor específico de las c/nPKC, Ro 32-0432 (10 $\mu$ M) durante 20 minutos antes de la estimulación con 2U/ml de trombina durante 5 minutos. **(B)** Las células se pre incubaron durante 20 minutos con el inhibidor de amplio espectro para las isoformas c/nPKC, estauoresporina (2.5-10nM) previo a la estimulación con trombina. Los extractos totales se inmunodetectaron utilizando. Los valores de los cultivos estimulados con trombina se establecieron como el 100% o control. Los datos se expresaron como la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes en donde sí. \*p <0.01, \*\*p <0.05, \*\*\*p <0.001 por Prueba t de Student, comparando en contra del control.

La viabilidad celular no se vio comprometida con ninguno de los fármacos inhibidores **(Figura 1S [C-F] Apéndice)**. Asimismo, el DMSO utilizado como el disolvente de algunos fármacos inhibidores no tuvo efecto sobre la fosforilación de FAK **(Figura 1S [A] Apéndice)**.

## 7. DISCUSIÓN

La migración celular es un proceso complejo donde señales intracelulares y extracelulares convergen para producir una respuesta coordinada <sup>74,131</sup>. Una característica común durante el desarrollo de la VRP es la exposición de las células del EPR a la trombina contenida en la sangre <sup>132,133</sup> como consecuencia de la ruptura de la BHR. Aunque la función más conocida de la trombina es un papel fundamental en la coagulación y sus efectos ha sido estudiados ampliamente en las células endoteliales <sup>134</sup>, los efectos de esta proteasa sobre las células del EPR no están del todo dilucidados. Sin embargo, se sabe que la trombina induce la transformación epitelio mesénquima (TEM) de las células del EPR, así como su proliferación y migración hacia la cavidad del cuerpo vítreo en donde provoca la generación de membranas celulares contráctiles de células del EPR <sup>48,50</sup> las que provocan el desprendimiento de la retina <sup>132</sup>.

A pesar de la evidencia que apoya la participación de FAK en la TEM de células de distintos tipos de cáncer y durante la metástasis <sup>135</sup>, se desconoce si FAK está involucrada en la transformación y migración de las células del EPR. Basados en un trabajo previo que demuestra la migración de células del EPR inducida por la trombina <sup>136</sup>, el objetivo principal del presente estudio fue investigar la participación de FAK para comprender mejor los mecanismos moleculares involucrados en la inducción de la migración de las células del EPR por la trombina.

En primer lugar, se demostró que la activación específica de PAR-1 por concentraciones de trombina encontradas en el suero sanguíneo (2U/ml) induce la fosforilación de FAK de los residuos Y576/577 del sitio catalítico de FAK (**Figura 1 y**

2), el posterior desensamble de las FA (**Figura 4**) y la promoción del movimiento celular (**Figura 3**).

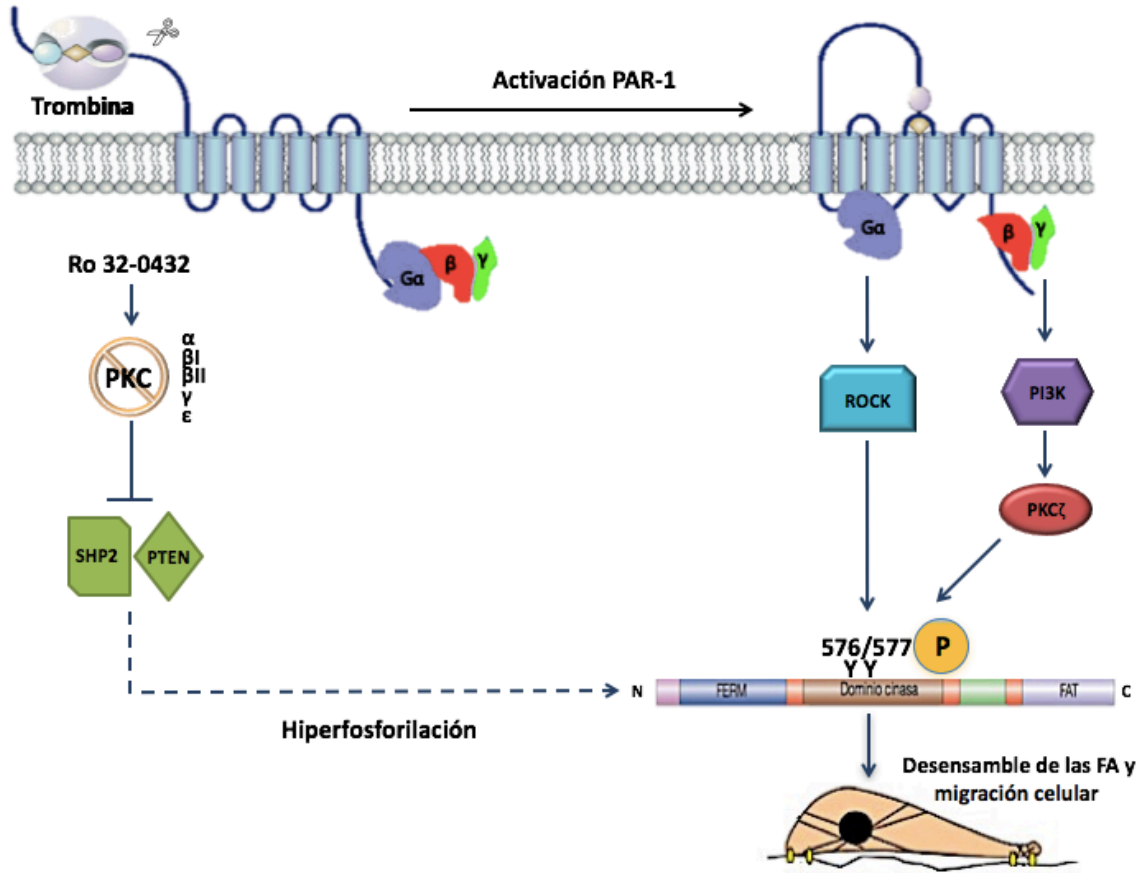
Por otro lado, diversos estudios señalan que la acción coordinada de las isoformas de la familia de PKC está involucrada en un amplio rango de respuestas celulares <sup>137</sup>, incluyendo la TEM y el consecuente aumento de las propiedades migratorias en células de distintos tipos de cáncer <sup>138-141</sup>. La familia de cinasas de serina/treonina de PKC incluye 12 isoformas clasificadas en 3 subfamilias, basadas en su mecanismo de activación: isoformas convencionales,  $\alpha$ ,  $\beta$ 1,  $\beta$ 2, y  $\gamma$  (cPKC) activadas por diacilglicerol (DAG) y calcio. Las isoformas nuevas  $\epsilon$ ,  $\delta$ ,  $\theta$ ,  $\eta$  (nPKC) activadas por DAG pero insensibles a calcio y las isoformas atípicas  $\zeta$  y  $\iota/\lambda$  (aPKC), que no responden ni a DAG ni a calcio y en su lugar poseen un dominio Phox-Bem (PB) que facilita la interacción con proteínas de andamiaje lo que conduce a su activación constitutiva <sup>137</sup>. Diez de estas isoformas: PKC $\alpha$ , PKC $\beta$ I, PKC $\beta$ II, PKC $\delta$ , PKC $\epsilon$ , PKC $\theta$ , PKC $\mu$ , PKC $\xi$ , PKC $\zeta$  y PKC $\iota$  se expresan en células del EPR humanas en cultivo <sup>142</sup>. Entre las vías activadas por PAR-1 se sabe que la familia de la PKC juega un papel importante en la migración celular <sup>136</sup>. Debido a esto y a la conocida función de FAK en la migración celular <sup>99</sup> se analizó la participación de distintas isoformas de PKC sobre la fosforilación de Y576/577 inducida por la trombina, lo anterior demostró que este efecto se produce por la activación de PI3K-PKC $\zeta$ . Por otra parte, la activación de FAK por PI3K-PKC $\zeta$  demostró ser la responsable de la migración de las células del EPR ya que esta se previno por la inhibición de PKC $\zeta$  o de su principal activador PI3K. Asimismo, se ha demostrado que FAK regula la migración celular a través del recambio de las FA y la generación de fibras de estrés de actina a través de la activación de RhoA y su efector

ROCK<sup>127,143</sup>. Así mismo, se sabe que FAK activa a pequeñas GTPasas de la familia de Rho a través de su unión directa con ellas y la fosforilación de sus factores de intercambio. FAK se une directamente a p190RhoGEF a través de su dominio FAT generando su fosforilación así como un aumento de GTP de Rho <sup>144,145</sup>. Así mismo se ha demostrado que la activación de PAR-1 por la trombina genera el acoplamiento de la G<sub>12/13</sub>, evento que promueve la activación de Rho/ROCK y la consecuente formación de fibras de estrés de actina, el incremento de la contractilidad celular y la migración <sup>75,146</sup>; así mismo, se ha propuesto a PKC $\zeta$  como un efector de Rho, lo que conduce a la polimerización de actina <sup>127,147</sup>. Nuestros resultados demuestran que la fosforilación de FAK inducida por la trombina se evita por la inhibición de PKC $\zeta$  o por el de su activador putativo PI3K (**Figura 5A y B**) así como por la inhibición de ROCK (**Figura 5C**). Lo anterior es consistente con trabajos previos que demuestran que la trombina promueve la formación de fibras de estrés de actina en las células del EPR a través de la vía de señalización PI3K/PKC $\zeta$  así como por Rho/ROCK <sup>61</sup>. Por otro lado, estudios en células cancerígenas han demostrado que la activación de PAR-1 promueve la activación de RhoA y la organización de las FA provocando la contracción celular, la disminución de la adhesión celular y la migración <sup>128</sup>. Un hallazgo novedoso de este trabajo fue que la inhibición de las isoformas c/nPKC aumentan significativamente la fosforilación de los residuos Y567/577 de FAK (**Figura 6**). Dado que la desfosforilación de tirosina es tan importante como la fosforilación en la regulación de los eventos de señalización en las FA, una posible explicación de este resultado podría ser que la actividad de las isoformas c/nPKC es necesaria para mantener un proceso de desfosforilación de FAK. Adicionalmente, se sabe de dos fosfatasas de tirosina

(SHP-2 y PTEN) implicadas en la migración de fibroblastos que regulan la desfosforilación de FAK <sup>148</sup>. Específicamente SHP-2, regula la activación de FAK a través de la desfosforilación del residuo Y397, el sitio de autofosforilación que inicia la función de FAK, lo que impide la posterior fosforilación de Y576/577 ocasionada por Scr <sup>149,150</sup>. Además se ha demostrado que la fosforilación de las isoformas de la PKC:  $\alpha$ ,  $\beta$ 1,  $\beta$ 2, y  $\eta$  activa a SHP-2, proceso que se bloquea completamente por el inhibidor de la PKC, bisindolilmaleimida <sup>151,152</sup>, lo que explicaría el aumento de la fosforilación de FAK observado en nuestro sistema sobre la inhibición de las c/nPKC por la bisindolilmaleimida, Rho 32-0432 (**Figura 6A**). Sin embargo, se ha señalado que la fosforilación de FAK producto de la inhibición de las c/nPKC provoca el desacople de FAK de las FA y su retención en el citoplasma <sup>153</sup>, lo que podría obstaculizar el reclutamiento de FAK en las nuevas adhesiones del borde delantero de la célula, evitando así la migración celular.

Colectivamente estos resultados develan un mecanismo novedoso por el que las isoformas PKC $\zeta$  y las c/nPKC pueden regular el recambio de las FA inducido por la trombina y la migración de las células del EPR a través de la regulación de la fosforilación de FAK.





**Figura 7.** Vías de señalamiento que conducen a la fosforilación de FAK en células del EPR de rata estimuladas con trombina. La explicación se detalla en el texto. PAR-1, receptor activado por proteasas; G $\alpha$ , $\beta$  y  $\gamma$ , subunidades miembro de las proteínas G heterotriméricas; ROCK, cinasas de Rho; PI3K, fosfatidilinositol-3-cinasa; PKC, proteína cinasa C; PKC $\zeta$ , miembro atípico de la familia de las PKC; Ro 32-0432, fármaco inhibidor de las isoformas nuevas y convencionales de las PKC; SHP2 y PTEN, fosfatasas de residuos de tirosina; Y576/577, residuos de tirosina de la cinasa de adhesión focal.

## **8. CONCLUSIONES**

Se demostró por primera vez que la trombina promueve la migración de las células del EPR a través de la fosforilación de FAK, mediante el desensamble de las FA. Estos efectos mostraron ser controlados diferencialmente por PKC $\zeta$  y las isoformas c/nPKC sugiriendo que el control de la fosforilación de FAK es crítico para la inducción de la migración de las células del EPR tras la exposición a la trombina debida a la alteración de la BHR, proporcionando así un objetivo putativo para el diseño de tratamientos farmacológicos encaminados a la prevención de la VRP.

## 9. LITERATURA CITADA

1. Rodieck, R. W. Seeing. in *The First Steps In Seeing* 327–360 (1998). doi:10.1017/CBO9781107415324.004
2. E Dowling, J. The retina: an approachable part of the brain. *Cambridge Harvard Univ. Press* 282 (1987). doi:10.1016/0092-8674(88)90378-9
3. Dowling, J. E. Organization of the vertebrate retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **9**, 655–680 (1970).
4. Sugino, I. K. *et al.* Cell-deposited matrix improves retinal pigment epithelium survival on aged submacular human Bruch's membrane. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **52**, 1345–58 (2011).
5. Hynes, R. O. The evolution of metazoan extracellular matrix. *Journal of Cell Biology* **196**, 671–679 (2012).
6. Varshney, S., Hunter, D. D. & Brunken, W. J. Extracellular Matrix components regulate cellular polarity and tissue structure in the developing and mature Retina. *Journal of Ophthalmic and Vision Research* **10**, 329–339 (2015).
7. Bryant, D. M. & Mostov, K. E. From cells to organs: building polarized tissue. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 887–901 (2008).
8. Etienne-Manneville, S. Polarity proteins in glial cell functions. *Current Opinion in Neurobiology* **18**, 488–494 (2008).
9. Arimura, N. & Kaibuchi, K. Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms. *Nat. Rev. Neurosci.* **8**, 194–205 (2007).
10. Krummel, M. F. & Macara, I. Maintenance and modulation of T cell polarity. *Nat. Immunol.* **7**, 1143–1149 (2006).
11. Van Agtmael, T. & Bruckner-Tuderman, L. Basement membranes and human disease. *Cell and Tissue Research* **339**, 167–188 (2010).
12. Wiradjaja, F., DiTommaso, T. & Smyth, I. Basement membranes in development and disease. *Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews* **90**, 8–31 (2010).
13. Yurchenco, P. D. & Patton, B. L. Developmental and pathogenic mechanisms of basement membrane assembly. *Curr. Pharm. Des.* **15**, 1277–94 (2009).
14. Timpl, R. Macromolecular organization of basement membranes. *Current Opinion in Cell Biology* **8**, 618–624 (1996).
15. Miner, J. H. & Yurchenco, P. D. Laminin functions in tissue morphogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **20**, 255–84 (2004).
16. Mouw, J. K., Ou, G. & Weaver, V. M. Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 771–785 (2014).
17. Reinhard, J., Joachim, S. C. & Faissner, A. Extracellular matrix remodeling during retinal development. *Exp. Eye Res.* **133**, 132–140 (2015).
18. Khoshnoodi, J., Pedchenko, V. & Hudson, B. G. Mammalian collagen IV. *Microsc. Res. Tech.* **71**, 357–370 (2008).
19. Iozzo, R. V., Cohen, I. R., Grässel, S. & Murdoch, A. D. The biology of perlecan: the multifaceted heparan sulphate proteoglycan of basement membranes and pericellular matrices. *Biochem. J.* **302**, 625–639 (1994).
20. Balasubramani, M. *et al.* Molecular interactions in the retinal basement membrane system: a proteomic approach. *Matrix Biol.* **29**, 471–83 (2010).
21. Young, R. W. Cell differentiation in the retina of the mouse. *Anat. Rec.* **212**, 199–205 (1985).
22. Durbeej, M. Laminins. *Cell and Tissue Research* **339**, 259–268 (2010).
23. Tang, J., Mohr, S., Du, Y.-D. & Kern, T. S. Non-uniform distribution of lesions and biochemical abnormalities within the retina of diabetic humans. *Curr. Eye Res.* **27**, 7–13 (2003).
24. Pulido, J. S. & Pulido JS. Anatomía funcional de la retina, coroides y vítreo. in *retina, coroides y vítreo* 10 (2003).
25. Strauss, O. The Retinal Pigment Epithelium in Visual Function. *Physiol. Rev.* **85**, 845–881 (2005).
26. Bok, D. The retinal pigment epithelium: a versatile partner in vision. *J. Cell Sci. Suppl.* **17**, 189–195 (1993).
27. Jeffery, G. The retinal pigment epithelium as a developmental regulator of the neural retina. *Eye* **12**, 499–503 (1998).

28. Boulton, M. & Dayhaw-Barker, P. The role of the retinal pigment epithelium: topographical variation and ageing changes. *Eye (Lond)*. **15**, 384–389 (2001).
29. Sheedlo, H. J. & Turner, J. E. Effects of retinal pigment epithelial cell-secreted factors on neonatal rat retinal explant progenitor cells. *J. Neurosci. Res.* **44**, 519–531 (1996).
30. Sheedlo, H. J. & Turner, J. E. Immunocytochemical characterisation of proteins secreted by retinal pigment epithelium in retinas of normal and Royal College of Surgeons dystrophic rats. *J. Anat.* **193 (Pt 2)**, 223–32 (1998).
31. Sheedlo, H. J. & Turner, J. E. Influence of a retinal pigment epithelial cell factor(s) on rat retinal progenitor cells. *Brain Res Dev Brain Res* **93**, 88–99 (1996).
32. Streilein, J. W., Ma, N., Wenkel, H., Fong Ng, T. & Zamiri, P. Immunobiology and privilege of neuronal retina and pigment epithelium transplants. *Vision Res.* **42**, 487–495 (2002).
33. Ishida, K., Panjwani, N., Cao, Z. & Streilein, J. W. 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**, 91–105 (2003).
34. Paulsson, M. Basement membrane proteins: structure, assembly, and cellular interactions. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **27**, 93–127 (1992).
35. Yurchenco, P. D. Basement membranes: Cell scaffoldings and signaling platforms. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, 1–27 (2011).
36. Abercrombie, M., Heaysman, J. E. M. & Pegrum, S. M. The locomotion of fibroblasts in culture. III. Movements of particles on the dorsal surface of the leading lamella. *Exp. Cell Res.* **62**, 389–398 (1970).
37. Izzard, C. S. & Lochner, L. R. Cell-to-substrate contacts in living fibroblasts: an interference reflexion study with an evaluation of the technique. *J. Cell Sci.* **21**, 129–159 (1976).
38. Nelson, C. M. & Bissell, M. J. Of extracellular matrix, scaffolds, and signaling: tissue architecture regulates development, homeostasis, and cancer. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **22**, 287–309 (2006).
39. Akhtar, N. & Streuli, C. H. An integrin–ILK–microtubule network orients cell polarity and lumen formation in glandular epithelium. *Nat. Cell Biol.* **15**, 17–27 (2013).
40. Yurchenco, P. D., Cheng, Y.-S., Campbell, K. & Li, S. Loss of basement membrane, receptor and cytoskeletal lattices in a laminin-deficient muscular dystrophy. *J. Cell Sci.* **117**, 735–42 (2004).
41. Ruiz-Torres, M. P. *et al.* The accumulation of extracellular matrix in the kidney: Consequences on cellular function. in *Journal of Nephrology* **18**, 334–340 (2005).
42. Kuo, D. S., Labelle-Dumais, C. & Gould, D. B. Col4a1 and col4a2 mutations and disease: Insights into pathogenic mechanisms and potential therapeutic targets. *Hum. Mol. Genet.* **21**, (2012).
43. Kim, S. H., Chu, Y. K., Kwon, O. W., McCune, S. A. & Davidorf, F. H. Morphologic Studies of the Retina in a New Diabetic Model; SHR/N:Mcc-cp Rat. *Yonsei Med. J.* **39**, 453–462 (1998).
44. Pascolini, D. & Mariotti, S. P. Global estimates of visual impairment: 2010. *Br. J. Ophthalmol.* **96**, 614–618 (2012).
45. Khan, M. A., Brady, C. J. & Kaiser, R. S. Clinical management of proliferative vitreoretinopathy: an update. *Retina* **35**, 165–175 (2015).
46. Hilton, G. *et al.* The Classification of Retinal Detachment with Proliferative Vitreoretinopathy. *Ophthalmology* **90**, 121–125 (1983).
47. Pastor, J. C. Proliferative vitreoretinopathy: An overview. *Survey of Ophthalmology* **43**, 3–18 (1998).
48. Campochiaro, P. A. *et al.* Pathogenic Mechanisms in Proliferative Vitreoretinopathy. *Arch. Ophthalmol.* **115**, 237 (1997).
49. Chiba, C. The retinal pigment epithelium: An important player of retinal disorders and regeneration. *Exp. Eye Res.* **123**, 107–114 (2014).
50. Garweg, J. G., Tappeiner, C. & Halberstadt, M. Pathophysiology of Proliferative Vitreoretinopathy in Retinal Detachment. *Surv. Ophthalmol.* **58**, 321–329 (2013).
51. Saika, S. *et al.* Epithelial-mesenchymal transition as a therapeutic target for prevention of ocular tissue fibrosis. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* **8**, 69–76 (2008).
52. Pennock, S., Haddock, L. J., Elliott, D., Mukai, S. & Kazlauskas, A. Is neutralizing vitreal growth factors a viable strategy to prevent proliferative vitreoretinopathy? *Progress in Retinal and Eye Research* **40**, 16–34 (2014).

53. Rouberol, F. & Chiquet, C. [Proliferative vitreoretinopathy: pathophysiology and clinical diagnosis]. *J. Fr. Ophthalmol.* **37**, 557–65 (2014).
54. Saika, S. *et al.* Effect of Smad7 gene overexpression on transforming growth factor beta-induced retinal pigment fibrosis in a proliferative vitreoretinopathy mouse model. *Arch. Ophthalmol.* **125**, 647–54 (2007).
55. Flanders, K. C. Smad3 as a mediator of the fibrotic response. *International Journal of Experimental Pathology* **85**, 47–64 (2004).
56. Ricker, L. J. A. G. *et al.* Prediction of proliferative vitreoretinopathy after retinal detachment surgery: Potential of biomarker profiling. *Am. J. Ophthalmol.* **154**, (2012).
57. Rusnak, S. *et al.* Defining the seriousness of proliferative vitreoretinopathy by aspiration of cytokines from the anterior chamber. *Biomark. Med.* **7**, 759–67 (2013).
58. Bian, Z.-M., Elner, S. G. & Elner, V. M. Thrombin-induced VEGF expression in human retinal pigment epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **48**, 2738–2746 (2007).
59. Parrales, A., Palma-Nicolás, J. P., López, E. & López-Colomé, A. M. Thrombin stimulates RPE cell proliferation by promoting c-Fos-mediated cyclin D1 expression. *J. Cell. Physiol.* **222**, 302–312 (2010).
60. Palma-Nicolás, J. P., López, E. & López-Colomé, A. M. Thrombin stimulates RPE cell motility by PKC-zeta- and NF-kappaB-dependent gene expression of MCP-1 and CINC-1/GRO chemokines. *J. Cell. Biochem.* **110**, 948–67 (2010).
61. Ruiz-Loredo, A. Y., López, E. & López-Colomé, A. M. Thrombin promotes actin stress fiber formation in RPE through Rho/ROCK-mediated MLC phosphorylation. *J. Cell. Physiol.* **226**, 414–423 (2011).
62. Traynelis, S. F. & Trejo, J. Protease-activated receptor signaling: new roles and regulatory mechanisms. *Curr. Opin. Hematol.* **14**, 230–235 (2007).
63. Soh, U. J., Dores, M. R., Chen, B. & Trejo, J. Signal transduction by protease-activated receptors. *British Journal of Pharmacology* **160**, 191–203 (2010).
64. Coughlin, S. R. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature* **407**, 258–264 (2000).
65. Vu, T. K. H., Hung, D. T., Wheaton, V. I. & Coughlin, S. R. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* **64**, 1057–1068 (1991).
66. Kahn, M. L. *et al.* A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature* **394**, 690–694 (1998).
67. Nystedt, S., Emilsson, K., Wahlestedt, C. & Sundelin, J. Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 9208–12 (1994).
68. Vu, T. K., Wheaton, V. I., Hung, D. T., Charo, I. & Coughlin, S. R. Domains specifying thrombin-receptor interaction. *Nature*. **353**, 674–677 (1991).
69. Xu, W. F. *et al.* Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 6642–6646 (1998).
70. Russo, A., Soh, U. J. K. & Trejo, J. Proteases display biased agonism at protease-activated receptors: location matters! *Mol. Interv.* **9**, 87–96 (2009).
71. Koivunen, J., Aaltonen, V. & Peltonen, J. Protein kinase C (PKC) family in cancer progression. *Cancer Letters* **235**, 1–10 (2006).
72. Houle, S. & Hollenberg, M. D. Proteinase-activated receptors. in *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference* 1–12 (2011). doi:10.1016/B978-008055232-3.60338-1
73. Russo, A., Soh, U. J. K. & Trejo, J. Department of Pharmacology, University of North Carolina, Chapel Hill and Department of Pharmacology, University of California, San Diego. *Rev. Lit. Arts Am.* **9**, 87–96 (2009).
74. Trepatt, X., Chen, Z. & Jacobson, K. Cell migration. *Compr Physiol* **2**, 2369–2392 (2012).
75. Raftopoulou, M. & Hall, A. Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Developmental Biology* **265**, 23–32 (2004).
76. Nobes, C. D. & Hall, A. Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* **81**, 53–62 (1995).
77. Ridley, A. J. & Hall, A. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal

- adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* **70**, 389–399 (1992).
78. Ridley, A. J., Paterson, H. F., Johnston, C. L., Diekmann, D. & Hall, A. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* **70**, 401–410 (1992).
  79. Petit, V. & Thiery, J. P. Focal adhesions: structure and dynamics. *Biol. Cell* **92**, 477–494 (2000).
  80. Shroff, H. *et al.* Dual-color superresolution imaging of genetically expressed probes within individual adhesion complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 20308–20313 (2007).
  81. Shroff, H., White, H. & Betzig, E. Photoactivated localization microscopy (PALM) of adhesion complexes. *Current Protocols in Cell Biology* (2008). doi:10.1002/0471143030.cb0421s41
  82. Shtengel, G. *et al.* Interferometric fluorescent super-resolution microscopy resolves 3D cellular ultrastructure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 3125–3130 (2009).
  83. Zamir, E. & Geiger, B. Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J. Cell Sci.* **114**, 3583–3590 (2001).
  84. Geiger, B. & Bershadsky, A. Assembly and mechanosensory function of focal contacts. *Current Opinion in Cell Biology* **13**, 584–592 (2001).
  85. Zaidel-Bar, R., Cohen, M., Addadi, L. & Geiger, B. Hierarchical assembly of cell-matrix adhesion complexes. *Biochem. Soc. Trans.* **32**, 416–20 (2004).
  86. Barczyk, M., Carracedo, S. & Gullberg, D. Integrins. *Cell Tissue Res* **339**, 269–280 (2010).
  87. Humphries, M. J. Integrin Structure. *Biochem. Soc. Trans.* **28**, 311–340 (2000).
  88. Tavella, S. *et al.* Regulated expression of fibronectin, laminin and related integrin receptors during the early chondrocyte differentiation. *J. Cell Sci.* **110** ( Pt 1), 2261–70 (1997).
  89. Vecino, E., Heller, J. P., Veiga-Crespo, P., Martin, K. R. & Fawcett, J. W. Influence of extracellular matrix components on the expression of integrins and regeneration of adult retinal ganglion cells. *PLoS One* **10**, (2015).
  90. Han, J. *et al.* Integrin  $\beta$ 1 subunit signaling is involved in the directed migration of human retinal pigment epithelial cells following electric field stimulation. *Ophthalmic Res.* **45**, 15–22 (2011).
  91. Emsley, J., Knight, C. G., Farndale, R. W., Barnes, M. J. & Liddington, R. C. Structural basis of collagen recognition by integrin  $\alpha$ 2 $\beta$ 1. *Cell* **101**, 47–56 (2000).
  92. Reyes, C. D. & García, A. J. Engineering integrin-specific surfaces with a triple-helical collagen-mimetic peptide. *J. Biomed. Mater. Res. A* **65**, 511–23 (2003).
  93. Von Bilderling, C., Caldarola, M., Masip, M. E., Bragas, A. V. & Pietrasanta, L. I. Monitoring in real-time focal adhesion protein dynamics in response to a discrete mechanical stimulus. *Rev. Sci. Instrum.* **88**, (2017).
  94. Wu, Y. *et al.* In-situ coupling between kinase activities and protein dynamics within single focal adhesions. *Sci. Rep.* **6**, 29377 (2016).
  95. Hanks, S. K., Calalb, M. B., Harper, M. C. & Patel, S. K. Focal adhesion protein-tyrosine kinase phosphorylated in response to cell attachment to fibronectin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 8487–8491 (1992).
  96. Schaller, M. D. *et al.* pp125FAK a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 5192–6 (1992).
  97. Fox, G. L., Rebay, I. & Hynes, R. O. Expression of Dfak56, a Drosophila homolog of vertebrate focal adhesion kinase, supports a role in cell migration in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 14978–83 (1999).
  98. Henry, C. a *et al.* Roles for zebrafish focal adhesion kinase in notochord and somite morphogenesis. *Dev. Biol.* **240**, 474–487 (2001).
  99. Mitra, S. K., Hanson, D. a & Schlaepfer, D. D. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 56–68 (2005).
  100. Girault, J. a, Labesse, G., Mornon, J. P. & Callebaut, I. Janus kinases and focal adhesion kinases play in the 4.1 band: a superfamily of band 4.1 domains important for cell structure and signal transduction. *Mol. Med.* **4**, 751–69 (1998).
  101. Sieg, D. J. *et al.* FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nat. Cell Biol.* **2**, 249–256 (2000).
  102. Chen, R. *et al.* Regulation of the PH-domain-containing tyrosine kinase Etk by focal adhesion kinase through the FERM domain. *Nat. Cell Biol.* **3**, 439–44 (2001).
  103. Schaller, M. D., Otey, C. A., Hildebrand, J. D. & Parsons, J. T. Focal adhesion kinase and paxillin bind to peptides mimicking  $\beta$  integrin cytoplasmic domains. *J. Cell Biol.* **130**, 1181–1187 (1995).

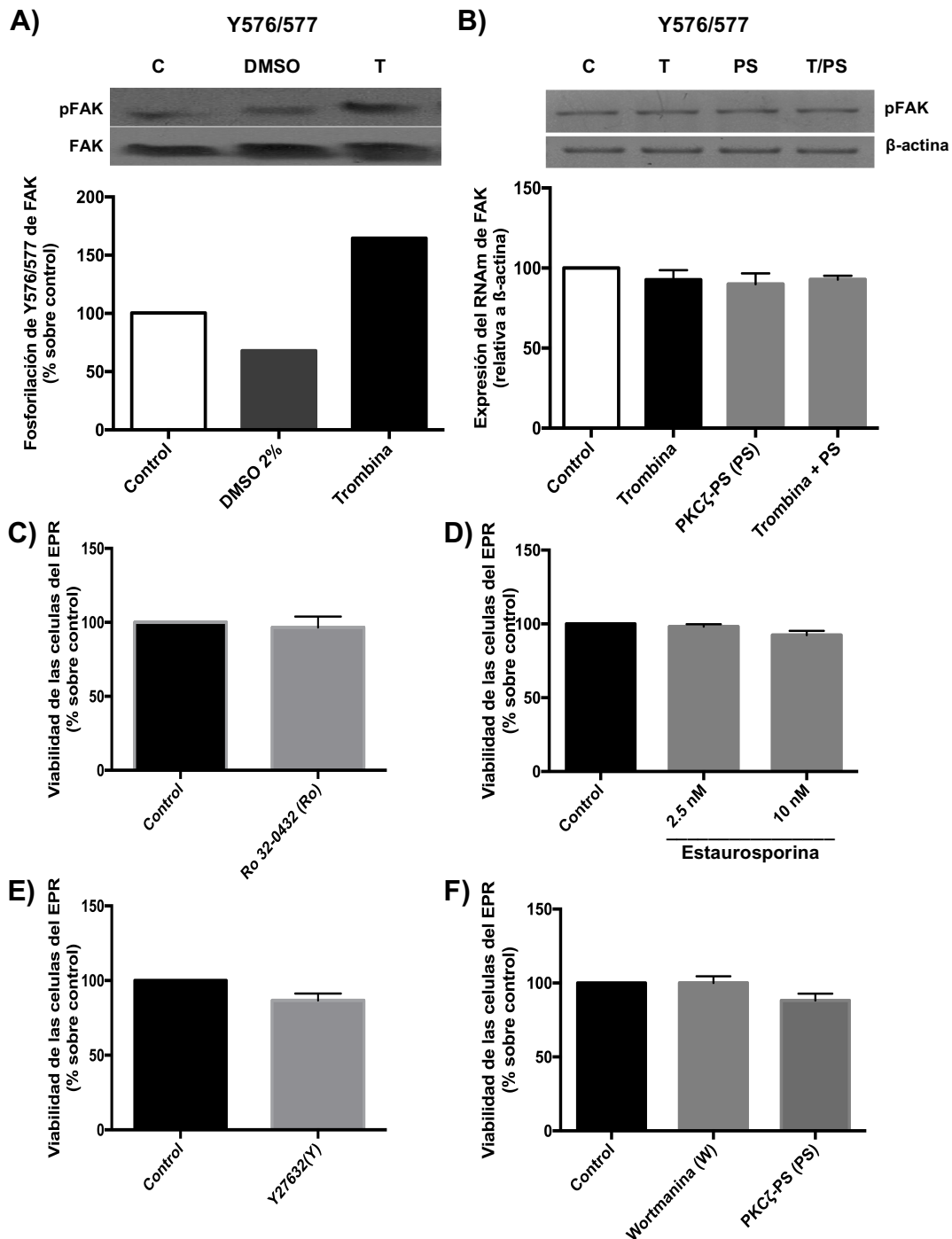
104. Kadaré, G. *et al.* PIAS1-mediated Sumoylation of Focal Adhesion Kinase Activates Its Autophosphorylation. *J. Biol. Chem.* **278**, 47434–47440 (2003).
105. Dunty, J. M. & Schaller, M. D. The N termini of focal adhesion kinase family members regulate substrate phosphorylation, localization, and cell morphology. *J. Biol. Chem.* **277**, 45644–45654 (2002).
106. Schlaepfer, D. D., Mitra, S. K. & Ilic, D. Control of motile and invasive cell phenotypes by focal adhesion kinase. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* **1692**, 77–102 (2004).
107. Turner, C. E., Glenney, J. R. & Burridge, K. Paxillin: A new vinculin-binding protein present in focal adhesions. *J. Cell Biol.* **111**, 1059–1068 (1990).
108. Sabe, H., Hata, a, Okada, M., Nakagawa, H. & Hanafusa, H. Analysis of the binding of the Src homology 2 domain of Csk to tyrosine-phosphorylated proteins in the suppression and mitotic activation of c-Src. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 3984–8 (1994).
109. Parsons, J. T. Focal adhesion kinase: the first ten years. *J. Cell Sci.* **116**, 1409–1416 (2003).
110. Ridley, A. J. *et al.* Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* **302**, 1704–9 (2003).
111. Schaller, M. D., Borgman, C. A. & Parsons, J. T. Autonomous expression of a noncatalytic domain of the focal adhesion-associated protein tyrosine kinase pp125FAK. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 785–791 (1993).
112. Taylor, J. M. *et al.* Selective expression of an endogenous inhibitor of FAK regulates proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 1565–72 (2001).
113. Hauck, C. R. *et al.* Inhibition of focal adhesion kinase expression or activity disrupts epidermal growth factor-stimulated signaling promoting the migration of invasive human carcinoma cells. *Cancer Res.* **61**, 7079–7090 (2001).
114. Abbi, S. *et al.* Regulation of focal adhesion kinase by a novel protein inhibitor FIP200. *Mol Biol Cell* **13**, 3178–3191 (2002).
115. Nowakowski, J. *et al.* Structures of the cancer-related Aurora-A, FAK, and EphA2 protein kinases from nanovolume crystallography. *Structure* **10**, 1659–1667 (2002).
116. Schlaepfer, D. D., Hauck, C. R. & Sieg, D. J. Signaling through focal adhesion kinase. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **71**, 435–478 (1999).
117. Toutant, M. *et al.* Alternative splicing controls the mechanisms of FAK autophosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 7731–43 (2002).
118. Zhou, J. *et al.* Mechanism of Focal Adhesion Kinase Mechanosensing. *PLoS Comput. Biol.* **11**, (2015).
119. Cobb, B. S., Schaller, M. D., Leu, T. H. & Parsons, J. T. Stable association of pp60src and pp59fyn with the focal adhesion-associated protein tyrosine kinase, pp125FAK. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 147–155 (1994).
120. Schaller, M. D., Hildebrand, J. D. & Parsons, J. T. Complex formation with focal adhesion kinase: A mechanism to regulate activity and subcellular localization of Src kinases. *Mol. Biol. Cell* **10**, 3489–3505 (1999).
121. Calalb, M. B., Polte, T. R. & Hanks, S. K. Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 954–63 (1995).
122. Subauste, M. C. *et al.* Vinculin modulation of paxillin-FAK interactions regulates ERK to control survival and motility. *J. Cell Biol.* **165**, 371–381 (2004).
123. Heller, J. P., Kwok, J. C. F., Vecino, E., Martin, K. R. & Fawcett, J. W. A Method for the Isolation and Culture of Adult Rat Retinal Pigment Epithelial (RPE) Cells to Study Retinal Diseases. *Front. Cell. Neurosci.* **9**, 449 (2015).
124. Webb, D. J., Parsons, J. T. & Horwitz, A. F. Adhesion assembly, disassembly and turnover in migrating cells -- over and over and over again. *Nat. Cell Biol.* **4**, E97-100 (2002).
125. Hu, Y.-L. *et al.* FAK and paxillin dynamics at focal adhesions in the protrusions of migrating cells. *Sci. Rep.* **4**, 1–7 (2014).
126. Chou, M. M. *et al.* Regulation of protein kinase C zeta by PI 3-kinase and PDK-1. *Curr. Biol.* **8**, 1069–1077 (1998).
127. Laudanna, C., Mochly-Rosen, D., Liron, T., Constantin, G. & Butcher, E. C. Evidence of  $\zeta$  protein kinase C involvement in polymorphonuclear neutrophil integrin-dependent adhesion and

- chemotaxis. *J. Biol. Chem.* **273**, 30306–30315 (1998).
128. Loberg, R. D., Tantivejkul, K., Craig, M., Neeley, C. K. & Pienta, K. J. PAR1-mediated RhoA activation facilitates CCL2-induced chemotaxis in PC-3 cells. *J. Cell. Biochem.* **101**, 1292–1300 (2007).
  129. Palma-Nicolas, J. P., López, E. & López-Colomé, A. M. PKC isoenzymes differentially modulate the effect of thrombin on MAPK-dependent RPE proliferation. *Biosci. Rep.* **28**, 307–317 (2008).
  130. Wilkinson, S. E., Parker, P. J. & Nixon, J. S. Isoenzyme specificity of bisindolylmaleimides, selective inhibitors of protein kinase C. *Biochem. J.* **294**, 335–337 (1993).
  131. Lauffenburger, D. a & Horwitz, a L. Cell migration: A physically integrated process. *Cell* **84**, 359–369 (1996).
  132. Pastor, J. C., De La Rúa, E. R. & Martín, F. Proliferative vitreoretinopathy: Risk factors and pathobiology. *Prog. Retin. Eye Res.* **21**, 127–144 (2002).
  133. Sakamoto, T. *et al.* Intercellular gap formation induced by thrombin in confluent cultured bovine retinal pigment epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **35**, 720–9 (1994).
  134. Birukova, A. A. *et al.* Role of Rho GTPases in thrombin-induced lung vascular endothelial cells barrier dysfunction. *Microvasc. Res.* **67**, 64–77 (2004).
  135. McLean, G. W. *et al.* The role of focal-adhesion kinase in cancer - a new therapeutic opportunity. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 505–515 (2005).
  136. Palma-Nicolás, J. P., López, E. & López-Colomé, A. M. Thrombin stimulates RPE cell motility by PKC- $\zeta$ - and NF- $\kappa$ B-dependent gene expression of MCP-1 and CINC-1/GRO chemokines. *J. Cell. Biochem.* **110**, 948–959 (2010).
  137. Steinberg, S. F. Structural basis of protein kinase C isoform function. *Physiol. Rev.* **88**, 1341–78 (2008).
  138. Griner, E. M. & Kazanietz, M. G. Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **7**, 281–94 (2007).
  139. Guo, H. *et al.* Reduction of protein kinase C zeta inhibits migration and invasion of human glioblastoma cells. *J. Neurochem.* **109**, 203–213 (2009).
  140. Sun, R. *et al.* Protein kinase C zeta is required for epidermal growth factor-induced chemotaxis of human breast cancer cells. *Cancer Res.* **65**, 1433–1441 (2005).
  141. Liu, Y. *et al.* Down-regulation of PKC $\zeta$  expression inhibits chemotaxis signal transduction in human lung cancer cells. *Lung Cancer* **63**, 210–218 (2009).
  142. Yu, K. *et al.* Expression of protein kinase C isoforms in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **245**, 993–9 (2007).
  143. Playford, M. P., Vadali, K., Cai, X., Burridge, K. & Schaller, M. D. Focal Adhesion Kinase regulates cell-cell contact formation in epithelial cells via modulation of Rho. *Exp. Cell Res.* **314**, 3187–3197 (2008).
  144. Torsoni, A. S., Marin, T. M., Velloso, L. a & Franchini, K. G. RhoA/ROCK signaling is critical to FAK activation by cyclic stretch in cardiac myocytes. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* **289**, H1488–H1496 (2005).
  145. Wozniak, M. A., Modzelewska, K., Kwong, L. & Keely, P. J. Focal adhesion regulation of cell behavior. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1692**, 103–119 (2004).
  146. Greenberg, D. L., Mize, G. J. & Takayama, T. K. Protease-activated receptor mediated RhoA signaling and cytoskeletal reorganization in LNCaP cells. *Biochemistry* **42**, 702–709 (2003).
  147. Gomez, J. *et al.* IL-2 signaling controls actin organization through Rho-like protein family, phosphatidylinositol 3-kinase, and protein kinase C-zeta. *J Immunol* **158**, 1516–1522 (1997).
  148. Angers-Loustau, A., Cote, J. F. & Tremblay, M. L. Roles of protein tyrosine phosphatases in cell migration and adhesion. *Biochem Cell Biol* **77**, 493–505 (1999).
  149. Hartman, Z. R., Schaller, M. D. & Agazie, Y. M. The tyrosine phosphatase SHP2 regulates focal adhesion kinase to promote EGF-induced lamellipodia persistence and cell migration. *Mol. Cancer Res.* **11**, 651–64 (2013).
  150. Yu, D. H., Qu, C. K., Henegariu, O., Lu, X. & Feng, G. S. Protein-tyrosine phosphatase Shp-2 regulates cell spreading, migration, and focal adhesion. *J. Biol. Chem.* **273**, 21125–21131 (1998).
  151. Strack, V. *et al.* The protein-tyrosine-phosphatase SHP2 is phosphorylated on serine residues 576 and 591 by protein kinase C isoforms  $\alpha$ ,  $\beta$ 1,  $\beta$ 2, and  $\eta$ . *Biochemistry* **41**, 603–608 (2002).
  152. Müssig, K. *et al.* Shp2 is required for protein kinase C-dependent phosphorylation of serine 307

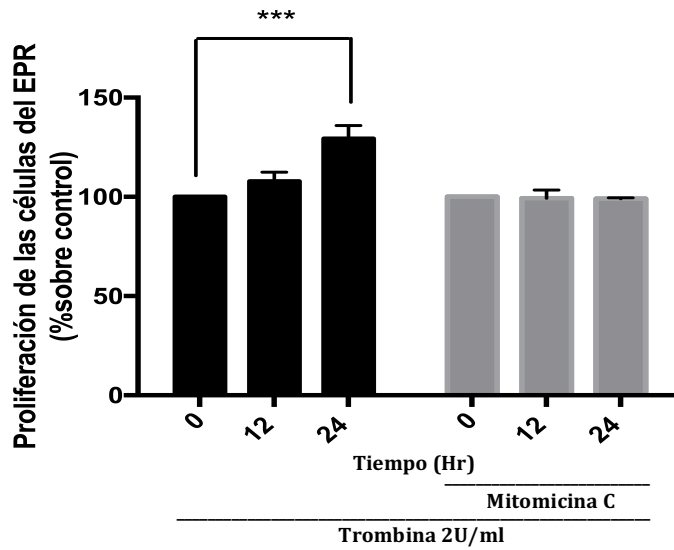


- in insulin receptor substrate-1. *J. Biol. Chem.* **280**, 32693–32699 (2005).
153. Rondé, P., Hamadi, A., Deramaudt, T. B. & Takeda, K. Hyperphosphorylated FAK delocalizes from focal adhesions to membrane ruffles. *J. Oncol.* (2010). doi:10.1155/2010/932803
154. Ramon y Cajal, S. The structure and connexions of neurons. *Nobel Lect. Physiol. or Med. 1901-1921* 220–253 (1906).

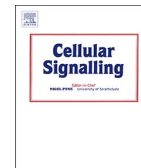
## 10. APÉNDICE



**Figura 1S.** Controles de la inhibición farmacológica de las moléculas de señalización. Para descartar la contribución de efectos no específicos por parte de los fármacos inhibidores sobre la fosforilación de FAK de los resultados de las figuras 5 y 6 (A) Se descarto el efecto del dimetilsulfóxido (DMSO) sobre la fosforilación de FAK (B) Se analizó la expresión del RNAm de FAK en presencia del del péptido pseudosubstrato miristoilado de PKC- $\zeta$  (PS) y finalmente se midió la viabilidad de las células del EPR ante los tratamientos con (C) Ro 32-0432, (D) estauosporina, (E) Y27632 y (F) Wortmanina o el péptido pseudosubstrato miristoilado de PKC- $\zeta$  (PS). La fosforilación de FAK se evaluó por Western blot; La expresión del RNAm de FAK se determinó mediante RT-PCR, la viabilidad celular se midió utilizando el método de reducción MTS. Como se demuestra, el DMSO no afecta la fosforilación de FAK, los fármacos inhibidos no afectan la viabilidad de las células del EPR y en el caso del tratamiento con PS no afecta la transcripción del RNAm de FAK. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM<sup>67</sup> de tres experimentos independientes por la prueba de t de Student comparando sobre el control.



**Figura 2S.** Inhibición de la proliferación celular de las células del EPR. Como control adicional para los experimentos de la **Fig. 3**, se evaluó la inhibición de la proliferación de las células del EPR con Mitomicina C utilizando el método de reducción de MTS. Los cultivos celulares del EPR se privaron de SFB durante 24 h antes de la estimulación con 2 U / ml de trombina durante 5 min. Se observó un aumento significativo en la proliferación, que se impidió completamente mediante la inclusión de 1  $\mu\text{g}$  / ml de Mitomicina C. Los resultados son la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes realizados por triplicado \*\*\* $p < 0,001$ , prueba t de Student, referida al control.



## FAK phosphorylation plays a central role in thrombin-induced RPE cell migration



E.D. Aguilar-Solis, I. Lee-Rivera, A. Álvarez-Arce, E. López, A.M. López-Colomé\*

Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Retina  
Proliferative vitreoretinopathy  
Signal transduction  
Focal adhesion

### ABSTRACT

The migration of retinal pigment epithelial (RPE) cells is an important step in various pathologic conditions including subretinal neovascularization (SRN), proliferative vitreoretinopathy (PVR) and, importantly, as a consequence of retinal surgery. Therefore, the elucidation of the mechanisms underlying RPE trans-differentiation and migration is essential for devising effective treatments aimed to the prevention of these disorders. A common event in these pathologies is the alteration of the blood-retina barrier (BRB), which allows the interaction of RPE cells with thrombin, a pro-inflammatory protease contained in serum. Our previous work has demonstrated that thrombin induces RPE cell cytoskeletal remodeling and migration, hallmark processes in the development of PVR; however, the molecular mechanisms involved are still unclear. Cell migration requires the disassembly of focal adhesions induced by Focal Adhesion Kinase (FAK) phosphorylation, together with the formation of actin stress fibers. The aim of the present work was to identify thrombin-activated signaling pathways leading to FAK phosphorylation and to determine FAK participation in thrombin-induced RPE cell migration. Results demonstrate that the activation of PAR1 by thrombin induces FAK autophosphorylation at Y397 and the subsequent phosphorylation of Y576/S77 within the activation loop. FAK phosphorylation was shown to be under the control of c/nPKC and PI3K/PKC- $\zeta$ , as well as by Rho/ROCK, since the inhibition of these pathways prevented thrombin-induced FAK phosphorylation and the consequent disassembly of focal adhesions, in parallel to FAK-dependent actin stress fiber formation and RPE cell migration. These findings demonstrate, for the first time, that thrombin stimulation of RPE cell transformation and migration are regulated by FAK tyrosine phosphorylation. Thus, targeting FAK phosphorylation may provide a strategic basis for PVR treatment.

### 1. Introduction

The retinal pigment epithelium (RPE) is the predominant component of the outer blood-retina barrier (BRB), and plays an essential role in the survival of retinal neurons and the maintenance of visual function [1]. The breakdown of the BRB has particularly grievous consequences to vision, since increased permeability of the BRB is an early event in the establishment of retinal diseases such as subretinal neovascularization, diabetic retinopathy, and proliferative vitreoretinopathy (PVR), a major cause of retinal surgery failure and the loss of vision [2].

The barrier integrity of cellular monolayers is directly related to the actin cytoskeleton, as has been shown by studies demonstrating an increase in the paracellular permeability by actin-disrupting agents [3,4]. Under pathological conditions involving the alteration of the BRB due to ocular trauma, retinal detachment or metabolic imbalance as occurs in diabetes, quiescent RPE cells undergo epithelial–mesenchymal transition (EMT) and uncontrolled proliferation, migrate to the

vitreous, and develop into contractile membranes on retinal surfaces, characteristic of PVR and other fibro-proliferative eye diseases leading to blindness [5,6]. RPE cell exposure to serum-contained thrombin upon the breakdown of the BRB has been associated with the development of PVR [7]. In addition to its well-known role in hemostasis, thrombin, a pro-inflammatory multifunctional serine protease activated upon tissue injury, has been shown to regulate cell proliferation, invasiveness and tumor growth in several cell types [8,9]. Our previous work has demonstrated that thrombin promotes RPE cell proliferation, cytoskeletal remodeling and migration [10–12]. Although the molecular mechanisms involved in these processes are still unclear, these data indicate that thrombin-induced activation of signaling cascades could be involved in the development of PVR. In fact, > 95% PVR cases occur as a result of retinal surgical procedures, a condition in which the RPE comes in direct contact with blood-contained thrombin [7].

Thrombin intracellular signaling is mediated by G protein coupled receptors (GPCRs) termed proteinase-activated receptors (PARs), activated by the proteolytic unmasking of a new N-terminal sequence that

\* Corresponding author at: Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Apartado Postal 70-253, Ciudad Universitaria, Mexico City, CdMx 04510, Mexico.

E-mail addresses: [daguilar@email.ifc.unam.mx](mailto:daguilar@email.ifc.unam.mx) (E.D. Aguilar-Solis), [ileeri@unam.mx](mailto:ileeri@unam.mx) (I. Lee-Rivera), [elopez@ifc.unam.mx](mailto:elopez@ifc.unam.mx) (E. López), [acolome@ifc.unam.mx](mailto:acolome@ifc.unam.mx) (A.M. López-Colomé).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2017.04.016>

Received 16 February 2017; Received in revised form 21 April 2017; Accepted 22 April 2017

Available online 23 April 2017

0898-6568/© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.



**Rama de Transducción de Señales de la  
Sociedad Mexicana de Bioquímica**

Otorga la presente

**CONSTANCIA a:**

***Eduardo Daniel Aguilar Solís***

quien asistió y presentó el trabajo:

**Activación de la cinasa de adhesión focal (pp125FAK) inducida por trombina en  
células del epitelio pigmentado de la retina (EPR)**

Por: Eduardo Daniel Aguilar Solís, Ana María López Colomé, Irene Lee Rivera y  
Edith Catalina López Hernández

en la modalidad de cartel, durante el V Congreso de Transducción de Señales,  
del 22 al 25 de septiembre de 2015, en la ciudad de Oaxaca, Oax.

Atentamente  
El Comité Organizador

**Dra. Erika Rendón Huerta**

**Dr. Enrique Ortega Soto**

**Dra. María Eugenia Torres Márquez**

**Dra. María Teresa Romero Ávila**