



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

Caracterización de la activación de la calpaína y su relación con la internalización de los Receptores Activados por Proteasa (PARs) en células del Epitelio Pigmentado de la Retina (EPR) estimuladas con trombina

Tesis
que para optar por el grado de:
Doctor en ciencias

Presenta:
Biól. Erik Alejandro Alvarez Arce

Director de tesis:
Dra. Ana María López-Colomé
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Comité tutor:
Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dr. Jesús Adolfo García-Sáinz
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Ciudad Universitaria, CDMX. Junio 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Agradecimientos institucionales

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Instituto de Fisiología Celular.

Al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas.

A las instituciones que financiaron este proyecto CONACyT 254333 y PAPIIT/UNAM IN205317.

A la Dra. Ana María López-Colomé por dirigir este trabajo.

A la Dra. Irene Lee-Rivera por las ideas y comentarios aportados a este trabajo.

A la Q. Edith López-Hernández por el apoyo técnico que permitió hacer este trabajo.

A los integrantes de mi comité tutorial:

Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez por su asesoría e ideas los cuales mejoraron la calidad de este trabajo.

Dr. Jesús Adolfo García-Sainz por sus comentarios e ideas los cuales mejoraron la calidad de este trabajo.

Al Dr. Arturo Hernández por su apoyo en los experimentos de calcio intracelular.

Al Dr. Iván Velazco por su apoyo en los experimentos de microscopía de epifluorescencia.

A la Dra. Laura Ongay por su apoyo técnico y asesoría en el análisis de datos de los experimentos de citometría de flujo.

Al Dr. Nicolás Jiménez Pérez por su apoyo técnico y asesoría en el análisis de datos de los experimentos de calcio intracelular.

A la Dra. Karla Méndez-Maldonado por su apoyo en la purificación y caracterización de los plásmidos usados en este trabajo; la asesoría en el análisis de datos de microscopía de epifluorescencia y citometría de flujo; además de las ideas aportadas para mejorar la calidad de este trabajo.

A la Dra. Itzel Escobedo Ávila por su apoyo técnico con la microscopía de epifluorescencia.

Al Dr. Abraham Rosas Arellano por el apoyo técnico y asesoría en el análisis de datos de los experimentos de FRET.

Al Dr. Josué Orlando Ramírez Jarquín por su apoyo técnico e ideas los cuales mejoraron la calidad de este trabajo.

Dedicatoria y agradecimientos

A la Dra. Karla Méndez-Maldonado: Mi compañera de vida, mi compañera de viaje, mi mejor amiga, mi inspiración. Gracias siempre, por guiarme cuando me pierdo, por alumbrarme cuando navego. Gracias porque a tu lado todas las noches son noches de boda; y todas las lunas son lunas de miel.

A Reyna y Alejandro, mis padres: Por sus consejos y enseñanzas, por su paciencia y amor.

A Israel, mi hermano: Gracias por tu amor, gracias por cuidarme, por comprenderme, por ser mi apoyo. Gracias por la sabiduría de tus consejos.

Al Maestro en Psicoterapia Daniel Villanueva, mi hermano. Gracias por tu cariño, por tu cuidado, por tenderme la mano cuando lo necesito. Por la suerte de tenerte en mi vida.

Al Dr. Josué Orlando Ramírez Jarquín. Gracias por cada momento, por ser un ejemplo, por cada idea. Y sobre todo, gracias por ser una inspiración para mí.

A mis queridos amigos: Will, Lucio, Ángel, Enano, Almendro, Paco.

Índice

Resumen	1
Abreviaturas	5
1. Introducción	8
1.1. La retina	8
1.2. El Epitelio Pigmentado de la Retina	10
1.3. La Vitreorretinopatía Proliferativa	11
1.4. La trombina	13
1.5. Los Receptores Activados por Proteasas	15
1.6. Endocitosis de GPCRs	18
1.7. La internalización de PAR1	20
1.8. La calpaína	21
1.9. Las Rab GTPasas y su participación en la internalización de receptores	25
1.10. Rab11FIP1 o Rab Coupling Protein (RCP)	29
2. Planteamiento del problema	32
3. Hipótesis	34
4. Objetivos	34
5. Materiales y métodos	35
5.1. Cultivo celular	35
5.2. Calcio intracelular	35
5.3. Activación de μ y m calpaínas	36
5.4. Western blot	37
5.5. Inmunocitoquímica	37

5.6. Citometría de flujo	38
5.7. Inmunoprecipitación	38
5.8. FRET	39
5.9. Microscopía confocal	39
5.10. Migración	40
5.11. Proliferación	40
5.12. Análisis estadístico	41
6. Resultados	42
6.1. La trombina y el agonista de PAR1 promueven un incremento de $[Ca^{2+}]_i$	42
6.2. El incremento de $[Ca^{2+}]_i$ tiene un origen intracelular y extracelular	45
6.3. La trombina y el agonista de PAR1 activan a la calpaína	47
6.4. La activación de la calpaína promueve la degradación de la α -espectrina	49
6.5. La calpaína regula la expresión de PAR1 en la membrana	52
6.6. La trombina promueve la degradación de la RCP	56
6.7. La trombina promueve el desensamble del complejo Rab11a/RCP	59
6.8. La calpaína regula el desensamble del complejo Rab11a/RCP	63
6.9. El complejo Rab11a/RCP regula la internalización de PAR1	66
6.10. El complejo Rab11a/RCP se relaciona con la degradación de PAR1	68
6.11. La inhibición de la calpaína y el complejo Rab11a/RCP atenúa la proliferación y migración de las células del EPR	71
7. Discusión	75
8. Conclusiones	81
9. Perspectivas	83

10. Referencias	84
11. Artículos publicados	92

Resumen

Los receptores activados por proteasa (PARs), pertenecen a una subfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs). A diferencia de los GPCRs que se activan por la unión de un ligando, los PARs se activan por el corte proteolítico de su extremo N-terminal, lo cual expone una nueva secuencia N-terminal que sirve como ligando del receptor. Se conocen cuatro miembros de esta familia de receptores (PAR 1, PAR2, PAR3 y PAR4), los cuatro PARs se activan por trombina, sin embargo, PAR1 es el prototipo de estudio de esta familia de receptores. La activación de PAR1 promueve un incremento en la concentración de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) a través de la vía de $Gq11\alpha$. Datos previos demuestran que la activación de PAR1 por trombina promueve la proliferación y migración de las células del Epitelio Pigmentado de la Retina (EPR), estos fenómenos son característicos de las enfermedades oculares fibroproliferativas que conducen a la ceguera. La activación de PAR1 por trombina es un fenómeno de naturaleza irreversible, por lo tanto, la finalización de su señalización, internalización y degradación del receptor se regula estrictamente ^{1,2}. La caracterización de los mecanismos moleculares que regulan la terminación de la señalización de PAR1 es fundamental para el entendimiento de las enfermedades fibroproliferativas de la retina.

En este trabajo caracterizamos el incremento de Ca^{2+} intracelular in vitro, promovido por la estimulación con trombina. Demostramos que la trombina promueve la internalización de PAR1. Demostramos que el incremento de $[Ca^{2+}]_i$ activa a la calpaína, una proteasa de cisteína dependiente de Ca^{2+} cuya activación se relaciona con la internalización de diferentes proteínas de membrana. Demostramos que la calpaína regula el proceso de internalización de PAR1, mediante la degradación de la α -espectrina. En un enfoque subsecuente,

analizamos a profundidad el mecanismo relacionado con la internalización de PAR1 y su transporte a lisosoma. Se sabe que Rab11a es la proteína G pequeña encargada de conducir a PAR1 activado al lisosoma, Rab11a interacciona con diferentes proteínas efectoras, una de ellas es la Rab Coupling Protein (RCP o Rab11FIP1). La interacción de Rab11a/RCP se relaciona con el tráfico de proteínas de membrana. Demostramos que el complejo Rab11a/RCP se relaciona con la internalización de PAR1 y su localización lisosomal, también demostramos que el mecanismo de internalización de PAR1 depende del desensamble del complejo Rab11a/RCP, de manera importante el desensamble del complejo Rab11a/RCP se regula mediante la activación de la calpaína. En resumen, los resultados muestran un nuevo mecanismo mediante el cual se regula la internalización de PAR1. Este proyecto proporciona un nuevo conocimiento en el área de la regulación de la internalización de los GPCRs y a su vez permite entender de mejor manera los mecanismos celulares que subyacen a las enfermedades oculares fibroproliferativas.

Abstract

Protease Activated Receptors (PARs) belong to a sub-family of G Protein Coupled Receptors (GPCRs). In contrast to classical GPCRs, PARs are activated by a proteolytical cleavage of their N-terminal domain; the new N-terminal domain generated an activation sequence for these receptors. Four members of this family of receptors are known (PAR1, PAR2, PAR3 and PAR4), all of them are activated by thrombin and PAR1 is considered as the prototype of this receptor family. PAR1 activation promotes an increase in intracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) through the Gq11 α pathway. It is known that thrombin-induced PAR1 activation promotes proliferation and migration of Retinal Pigment Epithelial cells (RPE), these phenomena are characteristic of the fibroproliferative diseases that leads to blindness. PAR1 activation is irreversible, therefore, finish signaling, internalization and degradation are strictly regulated. Characterization of the molecular mechanisms that define how PAR1 finishes signaling are essential for understanding retinal fibroproliferative diseases.

In this work, we characterized the $[Ca^{2+}]_i$ increase promoted by thrombin and demonstrated that thrombin promotes PAR1 internalization. We show that $[Ca^{2+}]_i$ increase promotes calpain activation. Calpain is a Ca^{2+} dependent cysteine protease whose activation is related with membrane protein internalization. We show that calpain is involved in PAR1 internalization through α -spectrin degradation. In a subsequent approach, we analyzed the proteins related with PAR1 internalization and lysosome pathway. It is known that Rab11a is responsible for the traffic of PAR1 to lysosome, Rab11a interact with different effector proteins, one of them is Rab Coupling Protein (RCP or Rab11FIP1). Rab11a/RCP complex

is related with membrane protein trafficking. We demonstrated that Rab11a/RCP complex disassembly is related with PAR1 internalization and lysosomal localization. We also show that Rab11a/RCP disassembly is regulated through calpain activation. In summary, this work provides information about a new mechanism that regulates PAR1 internalization. This project provides new knowledge in the GPCR internalization area and provides a better understanding of the cellular mechanisms that underly fibroproliferative eye diseases.

Abreviaturas

[Ca²⁺]_i. Concentración intracelular de calcio

AFU. Arbitrari Florescence Units

AP-2. Adaptator protein 2

AUC. Area Under the Curve

BHR. Barrera Hematorretiniana

BSA. Bovine Serum Albumin

cAMP. Cyclic Adenosine Monophosphate

CFP. Cyan Florescent Protein

CFTR. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

CTCF. Corrected Total Cellular Florescence

Cy5. Cyanine dye 5

DAG. Diacilglicerol

DMEMF12. Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12

EDTA. Ethylenediaminetetraacetic acid

EGFR. Epidermal Growth Factor Receptor

EGTA. Egtazic Acid

EPR. Epitelio Pigmentado de la Retina

FIPS. Rab11-family interacting proteins

FRET. Förster resonance energy transfer

G α . Proteina G heterotrimérica alfa

G $\beta\gamma$. Proteina G heterotrimérica beta-gama

G ι . Proteina G heterotrimérica i

G12/13. Proteína G heterotrimérica 12-13

GPCR. G Protein-Coupled Receptor

GRK. G protein-coupled receptor kinase

GTPasa. Trifosfatasa de guanosina

IP3. Inositol 1,4,5-trisphosphate

LAMP1. Lysosomal Associated Membrane Protein 1

LDL. Low Density Lipoprotein

NMDA. N-methyl-D-aspartate receptor

PARs. Protease-Activated Receptors

PDGF. Platelet-derived growth factor

pH. Potencial de hidrógeno

PIP2. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate

PLC. Phospholipase C

Rab11a. Ras-related protein Rab-11A

RBD. Rab Binding Domain

RCP. Rab Coupling Protein o Rab11FIP1

RE. Retículo Endoplásmico

RLU. Relative Luminescence Units

SFB. Suero Fetal Bovino

siRNA. Silencing RNA

SOCE. Store-Operated Calcium Channels

TEM. Transición Epitelio Mesénquima

TfR. Transferrin Receptor

TGF- β . Transforming growth factor beta

TRPC. Transient Receptor Potential Cation Channel

VEGF. Vascular endothelial growth factor

VRP. Vitreorretinopatía Proliferativa

YFP. Yellow Florescent Protein

1. Introducción

1.1. La retina

La retina de los mamíferos es un tejido estratificado que forma parte del sistema nervioso central. Su principal función es convertir la luz en una señal electroquímica que se envía al cerebro y se interpreta como una imagen. La información visual contiene características acerca de los diferentes elementos, como el contraste, el brillo y el movimiento. De cada uno de estos elementos se extrae la información visual captada en circuitos neuronales especializados de la retina, este proceso se denomina fototransducción. En la retina de mamíferos la fototransducción inicia en los fotorreceptores, en donde la luz absorbida se convierte en señales electroquímicas. Existen dos tipos de fotorreceptores: conos y bastones. Los conos se activan con luz brillante e intensa y son responsables de la visión a color, existen tres tipos de conos y cada uno posee un pigmento diferente; se llaman respectivamente pigmento sensible al azul, pigmento sensible al verde y pigmento sensible al rojo. Los bastones poseen un solo pigmento, la rodopsina, lo cual le confiere a la retina la capacidad de distinguir la visión en la oscuridad. Las señales generadas en los fotorreceptores se transmiten a las células bipolares, el paso de la información entre los fotorreceptores y las células bipolares se regula a través de un tipo celular llamado células horizontales. La señal pasa de las células bipolares a las células ganglionares. Del mismo modo que las células horizontales, las células amacrinas son interneuronas que regulan el paso de señal entre las células bipolares y las células ganglionares. Finalmente, la información de los elementos individuales se codifica como un potencial de acción en las células ganglionares y se envía al centro visual en el cerebro a través del nervio óptico (Fig. 1) ^{3,4}.

Además de los tipos celulares anteriormente mencionados, en la retina existen células encargadas de preservar el ambiente iónico de la retina; un ejemplo son las células de la glía de Müller, un tipo de glía radial que interviene en el mantenimiento del ambiente iónico, en interacciones metabólicas y en la modulación de la transmisión sináptica entre las neuronas. De manera particular, la capa posterior de la retina se conforma por las células del Epitelio Pigmentado de la Retina (EPR), entre otras funciones las células del EPR se encargan de dar mantenimiento a la retina y de regular el intercambio de agua y nutrientes ⁴. En la siguiente sección se profundiza en las características del EPR.

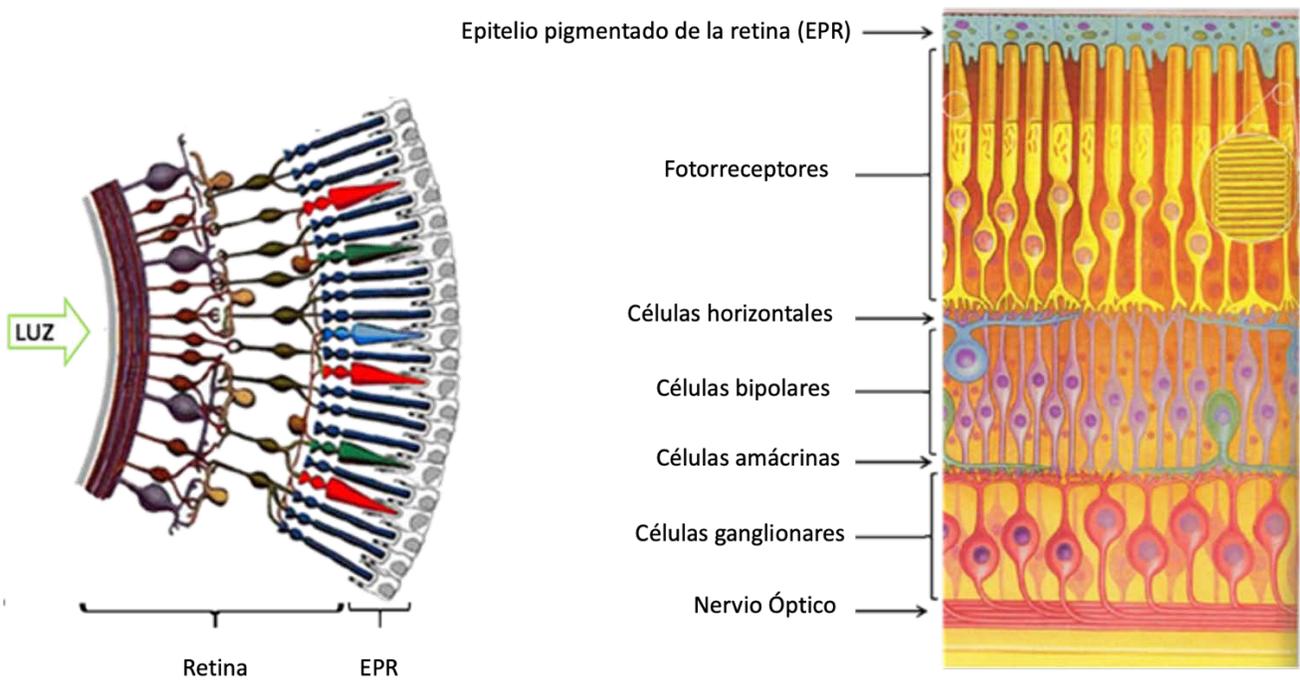


Fig. 1. Estructura de la retina. En la imagen se observan los distintos tipos celulares que conforman la retina. Las células de Epitelio Pigmentado de la Retina (EPR) forman una monocapa celular que se ubica en el fondo de la retina (Modificado de ⁴).

1.2. El Epitelio Pigmentado de la Retina

El epitelio pigmentado de la retina es una monocapa de células pigmentadas, que separan a la retina neural de la coroides. 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) ⁵. Las células del EPR reciben su nombre gracias a la presencia de gránulos citoplasmáticos de melanina, llamados melanosomas. Las células del EPR son polarizadas y presentan un dominio apical y un dominio baso-lateral. El EPR interactúa con la retina neural a través del dominio apical, mientras que la cara baso-lateral se orienta hacia la coroides. La interacción del EPR con la retina neural ocurre mediante numerosas microvellosidades que recubren parcialmente a los segmentos externos de los fotorreceptores. La cara baso-lateral tiene contacto directo con un tejido conectivo acelular, llamado membrana de Bruch, la cual separa al EPR del endotelio fenestrado de la coroides.

Entre otras funciones el EPR absorbe la luz dispersada para proteger a los fotorreceptores del daño fótico, mantiene la adhesión retinal y secreta factores de crecimiento ⁵. Las células del EPR se adhieren unas a otras, su función es esencial para la regulación de la homeostasis de la retina neural, confiriendo a la retina la propiedad de ser un sitio inmunológicamente privilegiado. ⁵. Las células del EPR regulan el transporte trans-epitelial de nutrientes como la glucosa ⁶ y la vitamina A ⁷. Las células del EPR degradan los segmentos externos de los fotorreceptores. De manera importante, el EPR es el principal elemento que conforma a la Barrera Hematorretiniana (BHR) ⁸.

1.3. La Vitreorretinopatía Proliferativa (VRP)

La Vitreorretinopatía Proliferativa (VRP) es un síndrome clínico asociado con el desprendimiento de la retina, debido a que las células con potencial proliferativo se multiplican y contraen en las superficies retinianas y el compartimento vítreo. La VRP presenta un espectro de severidad que varía desde las arrugas sutiles de la retina, a pliegues y rasgaduras fijas que conducen al desprendimiento total de la retina, en los casos más severos este padecimiento conduce a la ceguera ⁹.

En ojos normales, el desprendimiento de retina ocurre a una tasa de aproximadamente de 5 por 100.000 personas por año y la frecuencia de VRP permanece prácticamente sin cambios en el desprendimiento de retina, con una incidencia que oscila entre el 5,1% y el 11,7%¹⁰. La VRP es la causa más común de falla en la cirugía de desprendimiento de retina. Aunque en 90% de las cirugías se logra corregir el desprendimiento de la retina, entre el 5% y el 10% de los pacientes desarrolla VRP ¹¹. Aunque la reinserción quirúrgica de las retinas asociadas con la VRP se logra en la mayoría de los casos, los resultados relacionados con la recuperación de la visión siguen siendo decepcionantes. Por lo tanto, la prevención mediante el reconocimiento temprano de los factores de riesgo, los signos sutiles de VRP y la modificación apropiada de las técnicas quirúrgicas estándar para el desprendimiento de retina siguen siendo muy importantes ⁹.

Algunas de las causas de la VRP son: lesiones oculares, condiciones asociadas con la inflamación ocular prolongada, alteraciones de la BHR y en algunos casos la VRP se desarrolla en pacientes con hemorragia vítrea después de complicaciones quirúrgicas. La VRP se caracteriza porque las células de la retina sufren modificaciones mitogénicas y

quimiotácticas debido al contacto con diversos componentes del plasma sanguíneo que promueve la migración, proliferación y formación de membranas contráctiles, principalmente de las células del EPR, sin embargo, también las células gliales (Glía de Müller) participan en la formación de las membranas contráctiles características de la VRP ¹² (Fig 2).

El mayor componente de la BHR son las células del EPR ¹²⁻¹⁴. Se reconoce precisamente como un agente causal de la VRP el daño en la BHR. La función principal de la BHR es impedir el paso de los componentes de la sangre hacia el espacio subretiniano ¹². La ruptura de la BHR expone a las células del EPR a los agentes del suero sanguíneo como: El factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento epidermal (EGF), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y la trombina ¹⁵, además de diferentes citosinas ¹⁶. Una vez que los agentes presentes en el suero sanguíneo entran en contacto con las células del EPR, las células del EPR se des-diferencian hacia morfologías parecidas a fibroblastos. Este proceso de desdiferenciación involucra la activación de una compleja maquinaria molecular conocida como “transición epitelio-mesénquima” (TEM) ¹⁶ (Fig. 2). La TEM es un proceso en el que las células epiteliales se transforman en células mesenquimales y muestran alteraciones en la polarización y la adhesión intercelular, las células se transforman en migratorias e invasivas. El papel crítico de la TEM también se reconoce en numerosas afecciones patológicas, incluida la progresión tumoral y la fibrosis. La TEM juega un papel crítico en el desarrollo de la VRP ⁹. Además de la TEM, las células del EPR que entran en contacto con el plasma sanguíneo también presentan fenómenos de migración y proliferación. El elemento de mayor presencia en el plasma sanguíneo es la trombina. La trombina es uno de los factores presentes

en el plasma sanguíneo que entran en contacto con las células del EPR y promueven la transformación, migración y proliferación de dichas células epiteliales ¹⁶.

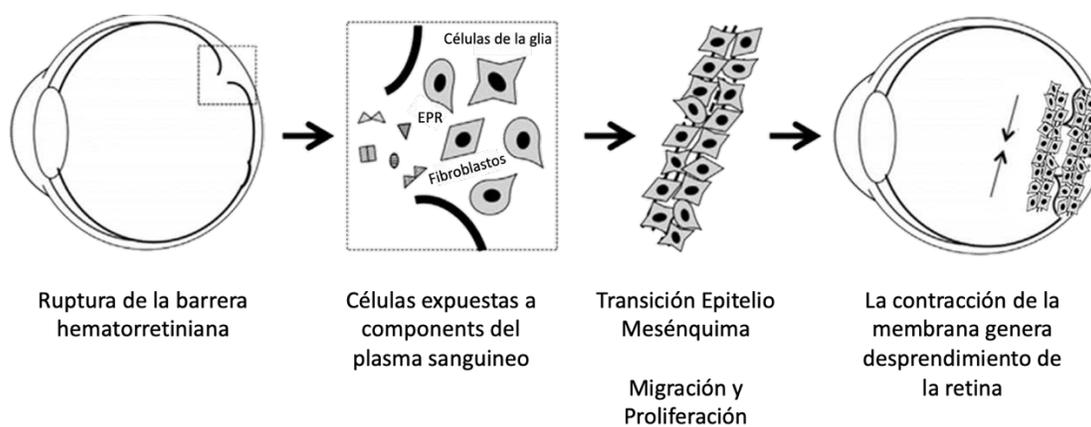


Fig. 2. Circunstancias que conducen al desarrollo de la VRP. La ruptura de la barrera hematorretiniana genera la exposición de las células del Epitelio pigmentado de la retina a componentes del plasma sanguíneo. Lo cual tiene como resultado la migración y proliferación de las células del Epitelio pigmentado de la retina (Modificado de¹⁷).

1.4. La trombina

La trombina es una proteasa de serina, codificada en humanos por el gen *F2*. La trombina se sintetiza en el hígado y se secreta a la circulación general como una proteína compleja inactiva llamada protrombina, zimógeno de la trombina ¹⁸. La trombina es el componente predominante del suero sanguíneo. Se sabe que la trombina se relaciona con diferentes procesos como: la agregación plaquetaria, en donde interviene en la coagulación, se considera el elemento más importante de la cascada de coagulación, debido principalmente a que actúa como un potente procoagulante o anticoagulante según las proteínas con las que interaccione ¹⁹. La trombina regula procesos como: la fibrinólisis, el crecimiento celular, la

permeabilidad endotelial y la angiogénesis ^{20,21} (Fig. 3). En contextos patológicos como el cáncer y otras enfermedades proliferativas, se ha relacionado la actividad de la trombina con proliferación, migración y metástasis (Fig. 3). Muestra de ello es el hecho de que tanto el factor tisular como la trombina están presentes en los microambientes de las células tumorales ²². Se sabe que la trombina induce en las células del EPR fenómenos similares a los existentes en las células cancerosas como son: la TEM, la migración y la proliferación ²³⁻²⁵. Aunque las células del EPR son estacionarias y mitóticamente inactivas, mantienen la capacidad de desdiferenciarse, proliferar y migrar como respuesta a un daño ²⁶. Estas evidencias apoyan la hipótesis de la participación de la trombina en el desarrollo de la VRP ¹⁵.

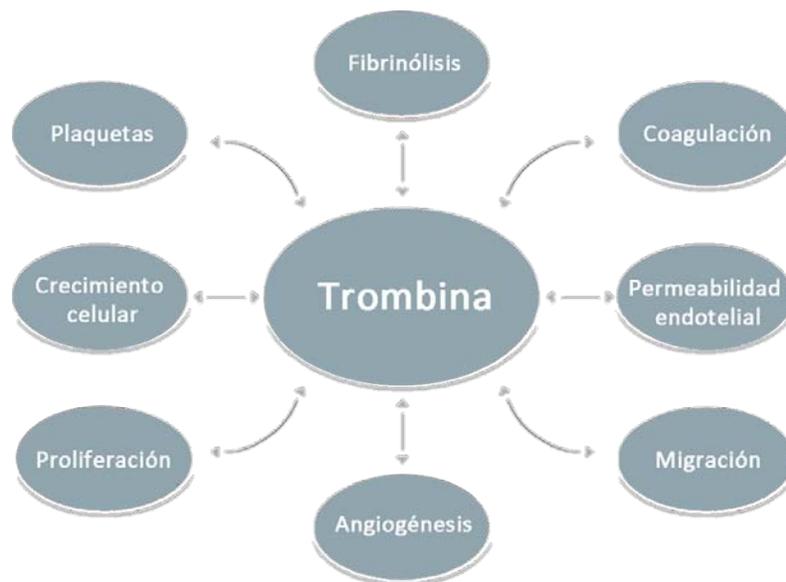


Fig. 3. Principales procesos biológicos regulados por la trombina. La trombina regula distintos procesos fisiológicos, de manera importante la trombina se relaciona con la migración y proliferación de células epiteliales (Alvarez-Arce 2015).

1.5. Los receptores Activados por Proteasas

La trombina ejerce sus efectos sobre las células a través de los Receptores Activados por Proteasas (PAR's). Los PAR's pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR). Los GPCR's son la familia más grande de proteínas de señalización en la membrana, se conocen más de 800 GPCRs en mamíferos. Los GPCRs se activan por una gama extraordinaria de agonistas, que incluyen hormonas, neurotransmisores y reguladores parácrinos, así como múltiples ligandos exógenos. Debido a su importancia en el control de la mayoría de los procesos fisiopatológicos, los GPCR son el blanco principal de más del 30% de los fármacos utilizados clínicamente. El mecanismo de activación de los GPCRs depende de la unión de su agonista al receptor. La unión del agonista produce cambios conformacionales en el receptor, el cual activa las subunidades $G\alpha$ de las proteínas G heterotriméricas a las que se une. La activación de las proteínas $G\alpha$ conduce a la disociación de los dímeros de $G\beta\gamma$ de $G\alpha$. $G\alpha$ y $G\beta\gamma$ activados inician procesos de señalización ²⁷.

Los receptores activados por proteasa (PARs) pertenecen a una subfamilia de GPCRs que a diferencia de los GPCRs clásicos, no se activan por la unión de un ligando, sino por el corte proteolítico de su extremo N-terminal. Se han descrito cuatro miembros de la familia de los PARs: PAR1, PAR2, PAR3 y PAR4, los cuales se activan por el corte proteolítico dado por la trombina. ²⁸⁻³⁰. PAR1 es el prototipo de esta familia de receptores (Fig. 4). La activación de PAR1 entre los residuos Arg41 y Ser42 desenmascara una nueva secuencia amino terminal (⁴²SFLLRN⁴⁷) que se une a la segunda asa extracelular del receptor y actúa como el ligando intermolecular del propio receptor ³¹. Las secuencias de los extremos N-terminales que activan a cada subtipo de estos receptores es distinta, PAR2 (³⁶R↓SLIGKV⁴²), PAR3

(³⁸K↓TFRGAP⁴⁴) y PAR4 (⁴⁷R↓GYPGQV⁵³)³⁰, esto constituye la característica molecular más importante para distinguir a cada uno de los subtipos de los PARs. La diferencia entre las secuencias que actúan como ligando de estos receptores permitió el desarrollo de péptidos que mimetizan el efecto de dichos extremos N-terminales generados después del corte proteolítico. Los péptidos sintéticos sirven como agonistas de los PARs y permiten el estudio de los efectos específicos de cada uno de los receptores³².

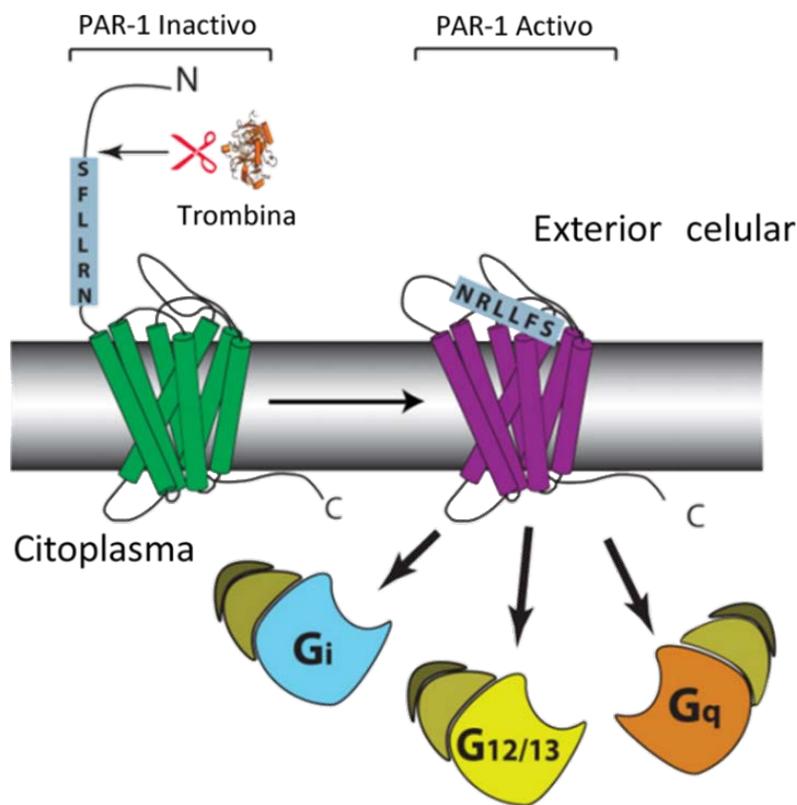


Fig. 4. Estructura del Receptor Activado por Proteasa 1. El receptor activado por proteasas 1 (PAR1) está acoplado a proteínas G heterotriméricas. Su activación ocurre por el corte dado por la trombina. La trombina genera un nuevo N- terminal en PAR1, dicha secuencia sirve como activador del propio receptor (Modificado de³³).

La activación de los PARs induce una gran diversidad de respuestas celulares. La activación de PAR1 desencadena el señalamiento a través de las proteínas G heterotriméricas G12/13, Gi y Gq/11¹. La activación de G12/13 a través de PAR1, induce a la activación de la vía de la GTPasa Rho, esto conduce a la célula a la remodelación del citoesqueleto y la formación de fibras de estrés de actina³⁴. Del mismo modo, la activación de Gi regula la inhibición de la enzima adenilil ciclasa y la subsecuente disminución en la formación de cAMP (AMP cíclico)³⁵. La activación de PAR1 se relaciona con la activación de la proteína heterotrimérica Gq. La subunidad α de Gq activa a la fosfolipasa C (PLC), una enzima encargada de catalizar la hidrólisis del fosfatidilinositol-bifosfato (PIP2) en dos productos: inositol-trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). El IP3 promueve la liberación de Ca^{2+} de las pozas intracelulares, mediante la unión a receptores de IP3 (IP3R) en el retículo endoplásmico (RE), mientras que el DAG permanece anclado a la membrana y activa a la proteína cinasa C³⁶ (Fig. 5).

En la retina, se ha descrito que la activación de PAR1, por la trombina, incrementa el Ca^{2+} intracelular en células de la glía de Müller³⁷, lo mismo se ha observado en células ganglionares³⁸ y en células del EPR^{39,40}. En las células del EPR se ha descrito que el incremento de Ca^{2+} se relaciona con la migración⁴¹ y la proliferación⁴², ambos fenómenos son característicos de las enfermedades fibroproliferativas de la retina como la VRP. Debido a la importancia de los procesos celulares regulados por PAR1, el estudio de la activación y el tráfico intracelular de este receptor es crítico para el entendimiento de su función y las implicaciones en los fenómenos regulados por trombina como la VRP.

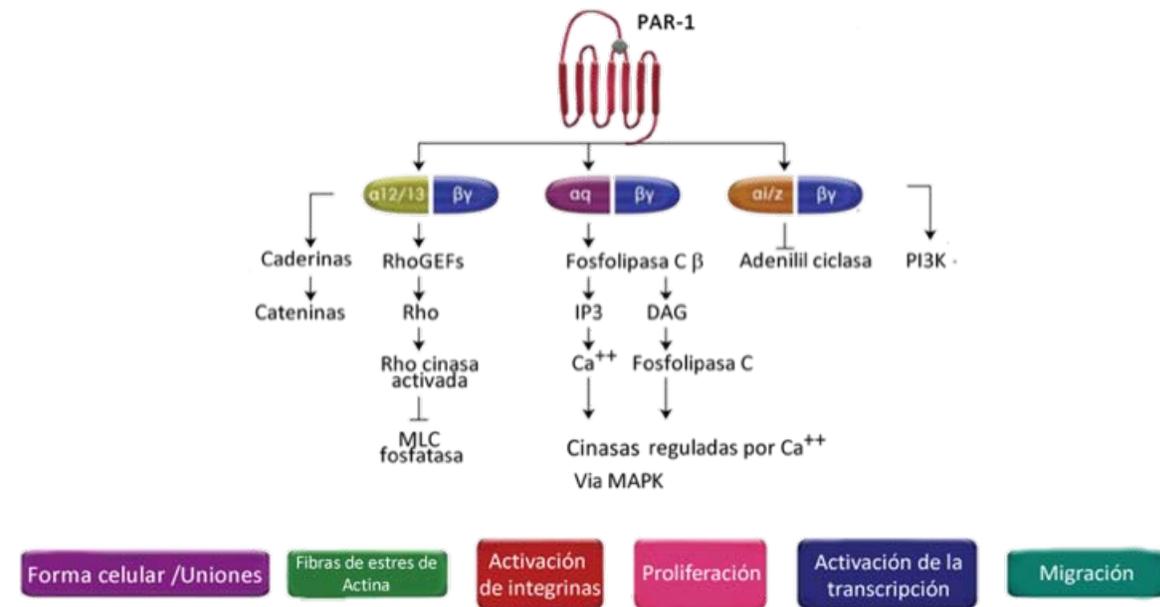


Fig. 5. Vías de señalización reguladas por la activación de PAR1). La trombina activa diferentes vías de señalización, las más relevantes son la vía de Rho, Fosfolipasa C, Adenilil ciclasa y fosfoinositol 3-cinasa (PI3K). la activación de algunas de estas vías conduce a migración y proliferación de las células epiteliales (Modificado de ⁴³)

1.6. Endocitosis de GPCRs

Los GPCRs unidos al agonista inician la señalización activando proteínas G heterotriméricas en la membrana plasmática, luego, los GPCRs se someten rápidamente a fosforilación por cinasas de GPCR (GRK) que fosforílan selectivamente a los receptores, en una actividad dependiente de ATP, la finalidad es detener la señalización del receptor. La fosforilación del receptor y posterior unión de β-arrestina impide la interacción de los receptores con las proteínas G heterotriméricas, terminando efectivamente la señalización mediada por las diferentes proteínas G. ⁴⁴ (Fig. 6). Si bien la fosforilación y la unión de β-arrestina detiene la señalización de los GPCRs, no es suficiente para terminar por completo la señalización de los PARs, dada la naturaleza de su activación irreversible.

La endocitosis de los receptores es el proceso mediante el cual las células eucariontes internalizan receptores de unión a ligando a través de vesículas recubiertas de clatrina formadas en la propia membrana. Después de la internalización de estos receptores las vesículas se fusionan con estructuras periféricas preexistentes para formar un organelo conocido como endosoma de clasificación. En el endosoma el cambio de pH promueve que los receptores se separen de su ligando, los receptores se reciclan y regresan a la membrana. Por el contrario, muchos receptores no se separan de su ligando y se dirigen a los lisosomas donde se degradan ⁴⁵. La endocitosis inducida por ligando puede conducir a los receptores a través de una vía de reciclaje o bien a través de una vía de degradación dentro de un lisosoma, ambos mecanismos producen efectos opuestos sobre la duración de la señalización.

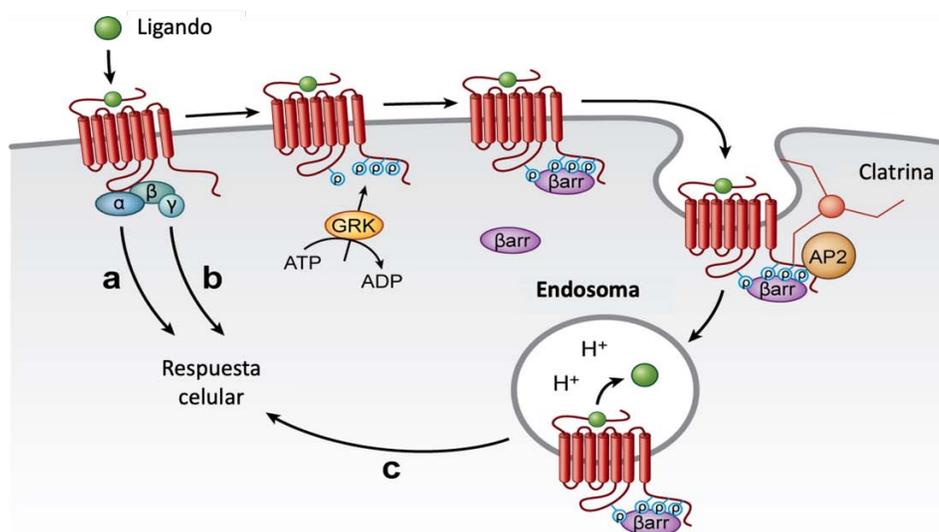


Fig. 6. Internalización de los GPCRs. Los GPCRs se internalizan a través de dos vías, una de ellas permite su reciclaje y la otra promueve su degradación. a) Señalización a través de la subunidad α de la proteína G heterotrimérica. b) Señalización a través del dímero $\beta\gamma$ de la proteína G heterotrimérica. c) Resensibilización del receptor (Tomado de ⁴⁴).

La vía de reciclaje promueve la recuperación rápida (o re-sensibilización) de la capacidad de respuesta celular. Por el contrario, la vía lisosomal detiene por completo la señalización. Ambas vías convergen mientras el receptor está contenido en los endosomas de selección o endosomas tardíos, en este momento, sin importar la vía de selección los receptores pueden señalizar y activar diferentes vías con ayuda de las β -arrestinas⁴⁵. En algunos casos los receptores se regulan por ambas vías, un ejemplo de ello es el receptor β 2-adrenérgico, el cual se recicla predominantemente después de la endocitosis inicial inducida por el agonista, sin embargo, experimenta una regulación negativa después de una exposición prolongada a los agonistas. Se cree que dicha plasticidad en la regulación del receptor es fisiológicamente importante y contribuye a la pérdida de efectividad del agonista⁴⁴.

1.7. La internalización de PAR1

A diferencia de los GPCRs clásicos de unión a ligando, la internalización y posterior degradación de PAR1 es un mecanismo fundamental para la desactivación del receptor dada la naturaleza de su activación proteolítica irreversible, la escisión proteolítica de PAR1 da lugar a una activación sostenida³¹. Existen dos mecanismos que regulan la internalización de PAR1: PAR1 no activado, se recicla de manera constitutiva en endosomas, del mismo modo que los GPCRs clásicos. Este mecanismo permite a la célula resensibilizarse rápidamente, después de la exposición a la trombina^{46,47}. En la internalización constitutiva de PAR1 no activado, es necesaria la presencia de AP-2 en las vesículas recubiertas de clatrina¹. Por otro lado, PAR1 activado se internaliza y se dirige a lisosomas, donde se degrada para detener su señalización^{2,31}, sin embargo la internalización de PAR1 activado es independiente de la proteína de activación 2 (AP-2)¹.

Similar a otros GPCRs se sabe que PAR1 se fosforila en su extremo C-terminal, para detener la señalización ³¹. La terminación rápida de la señalización de PAR1 se regula por la fosforilación por GRK3 y GRK5. Sin embargo, no es el único mecanismo que detienen la señalización de PAR1. Se sabe que la señalización de PAR1 incrementa por la unión de β -arrestina. La unión de β -arrestina, requiere de la fosforilación del receptor, en el caso de PAR1 la unión de β -arrestina es independiente de la fosforilación del segmento C-terminal de PAR1 ^{31,48}. La gran mayoría de los GPCR se internalizan desde la membrana plasmática a través de vesículas recubiertas de clatrina y dinamina. La dinamina es una GTPasa que regula la formación de vesículas recubiertas de clatrina y en algunas células facilita el desprendimiento de caveolas. Datos recientes demuestran que la internalización de PAR1 es dependiente de clatrina, dinamina, y AP-2 en el caso de la internalización constitutiva, sin embargo, se sugiere que la unión de β -arrestinas no es necesaria para la internalización de PAR1 ⁴⁸. Experimentos en los cuales se promueve la internalización de PAR1 con un péptido agonista (SFLLRNPNDKYEPF-NH₂), muestran que la internalización de PAR1 no depende de β -arrestina, por lo tanto, aún se discute si la unión de β -arrestina es esencial para la internalización de PAR1 ^{31,49}. Estos mecanismos son similares tanto para la internalización constitutiva de PAR1 no activado, como para la internalización de PAR1 activado¹.

1.8. La calpaína

Las calpaínas son proteínas con diferentes funciones, de manera importante algunas isoformas de la calpaína regulan la internalización de diferentes lípidos y proteínas. La función de distintas proteínas depende del incremento del Ca²⁺ intracelular. La calpaína pertenece a una familia de proteasas de cisteína. Existen 15 isoformas de calpaína. Dos de

ellas son ubicuas y se denominan m-calpaina y μ -calpaina, debido a que se activan con concentraciones milimolares (0.5-1 mM) y micromolares (3-50 μ M) de Ca^{2+} intracelular respectivamente. El resto de las isoformas de las calpaínas son específicas de diferentes tejidos ⁵⁰. Las calpaínas son proteínas conformada por dos subunidades, una subunidad de 78-80 kDa que contiene el dominio catalítico y una subunidad de 29 kDa, importante para la estabilidad y el funcionamiento de la subunidad de 80KDa ⁵⁰.

La subunidad catalítica se subdivide en cuatro dominios (I – IV). El dominio I se localiza en el extremo N-terminal y se autoescinde durante la activación autocatalítica. El dominio II contiene los residuos esenciales de cisteína, asparagina e histidina del sitio catalítico. El dominio III no tiene una secuencia de homología obvia con otras proteínas, y su función es desconocida. El dominio IV es un dominio similar al dominio de calmodulina, contiene cinco sitios de unión a Ca^{2+} (EF-hand-helix-loop-helix). La pequeña subunidad reguladora se subdivide en dos dominios, V y VI; el primero N-terminal es un dominio rico en glicina, y el segundo, un dominio de calmodulina probablemente es homólogo del dominio IV de la subunidad catalítica. Los dominios de calmodulina de las dos subunidades se asocian para formar la calpaína heterodimérica (Fig. 7) ⁵⁰. La unión del Ca^{2+} provoca cambios conformacionales en la molécula que dejan expuesto el sitio catalítico de la calpaína ⁵¹.

Muchas proteínas de corta duración que carecen de actividad proteolítica contienen secuencias PEST que son segmentos ricos en prolina (P), glutamato (E), serina (S) y treonina (T). Se cree que estas secuencias PEST designadas son señales intramoleculares putativas para la degradación proteolítica rápida. Se sabe que varias proteínas de unión a calmodulina contienen secuencias PEST y son susceptibles a la proteólisis por proteasas neutras

endógenas como la m-calpaína y la μ -calpaína (Barnes and Gomes, 1995). Por lo tanto, los sustratos de la calpaína presentan secuencias de tipo PEST o modificaciones de dicha secuencia ⁵⁰.



Fig. 7. Subunidades que conforman a la calpaína. La calpaína se conforma de dos sub-unidades las cuales interactúan para regular la actividad proteolítica de la calpaína, mediante un mecanismo dependiente del incremento celular de Ca^{2+} (Modificado de ⁵¹).

La calpaína se relaciona con diversos procesos celulares, como la migración, la remodelación del citoesqueleto de actina, la señalización celular, la función de factores de transcripción, además de la muerte celular programada ⁵³. Se sabe que la calpaína regula la internalización en vesículas recubiertas de clatrina y que este mecanismo depende tanto del aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} , que activa a la calpaína, como de la proteólisis de diferentes sustratos ⁵⁴. La calpaína se relaciona con la internalización de distintas proteínas de membrana mediante vesículas recubiertas de clatrina, como el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR) ⁵⁵, el receptor de transferrina (TfR) ⁵⁶ y el regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) ⁵⁷. Del mismo modo la

internalización de la lipoproteína de baja densidad (LDL), se regula a través de un mecanismo dependiente de la activación de la calpaína y la degradación de una proteína de citoesqueleto, la α -espectrina⁵⁸.

La espectrina es una proteína larga y flexible que existe como un heterotetramero formado por varias isoformas de subunidades de α -espectrina y β -espectrina. Las subunidades α y β se ensamblan de forma antiparalela para formar dímeros de α - β en forma de varilla, que a su vez se asocian entre sí para formar tetrámeros. Cada extremo del tetrámero se une al citoesqueleto de actina, esto permite a la espectrina formar enlaces cruzados con los filamentos de actina generando así una red extendida que da soporte a la membrana plasmática⁵⁹. La α -espectrina es una proteína que tiene diversas secuencias PEST a lo largo de su estructura, por lo tanto es una proteína sustrato de la μ -calpaína contrario a ello, la m -calpaína no degrada a la α -espectrina. La degradación de la espectrina se relaciona con procesos celulares como el transporte dirigido por microtúbulos y el transporte de proteínas de membrana como los receptores a través de las vías secretoras y endocíticas (Machnicka et al. 2012, Kamal, Ying, and Anderson 1998).

La otra vía reguladora importante durante la remodelación del citoesqueleto, es la fosforilación de la espectrina. Se sabe que la fosforilación de β -espectrina es esencial en la desestabilización del citoesqueleto de la membrana de los eritrocitos. Del mismo modo, la fosforilación de la α -espectrina en la secuencia PEST, sitio de escisión de la calpaína, es un mecanismo que regula la disponibilidad del sitio PEST en la α -espectrina y, por lo tanto, regula el corte de la calpaína. La α -espectrina es un punto clave en las vías de señalización

mediadas por Ca^{2+} . Este tipo de control es importante en el tráfico de vesículas, endocitosis, crecimiento de neuritas y activación del receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA) ⁶⁰. Por lo tanto, la internalización de proteínas de membrana requiere del corte de la α -espectrina para permitir la formación de las vesículas recubiertas de clatrina y la remodelación del citoesqueleto de actina que conducen a los endosomas dentro de la célula⁶⁰. Además, se sabe que el incremento de Ca^{2+} intracelular aumenta la afinidad de la calpaína por la α -espectrina en un mecanismo que regula la internalización de la proteína de baja densidad (LDL), para la producción de colesterol ^{61,62}.

1.9. Las Rab GTPasas y su participación en la internalización de receptores

Del mismo modo que la calpaína regula la internalización de lípidos y proteínas, existe otro grupo de proteínas relacionado con el tráfico endosomal de moléculas, algunas de las proteínas reguladoras más estudiadas son las Rab GTPasas ⁶³. Las proteínas Rabs son GTPasas pequeñas que pertenecen a la superfamilia de las proteínas pequeñas Ras GTPasas, existen 60 isoformas de Rabs GTPasas, su función es principalmente regular el tráfico vesicular ⁶³. Como otras GTPasas, todas las Rabs tienen motivos de unión a GTP y GDP. Las proteínas intercambiadoras del nucleótido de guanina (GEFs) y las proteínas activadoras de GTPasa (GAPs) regulan el paso entre el estado activo de las Rabs (GTP) y el estado inactivo (GDP) ⁶⁴. En su estado inactivo las Rabs se insertan en la membrana correspondiente y en su estado activo cada isoforma de las Rabs, de manera específica, recluta a las diferentes proteínas efectoras encargadas de llevar a cabo las funciones necesarias para el transporte vesicular ⁴⁵.

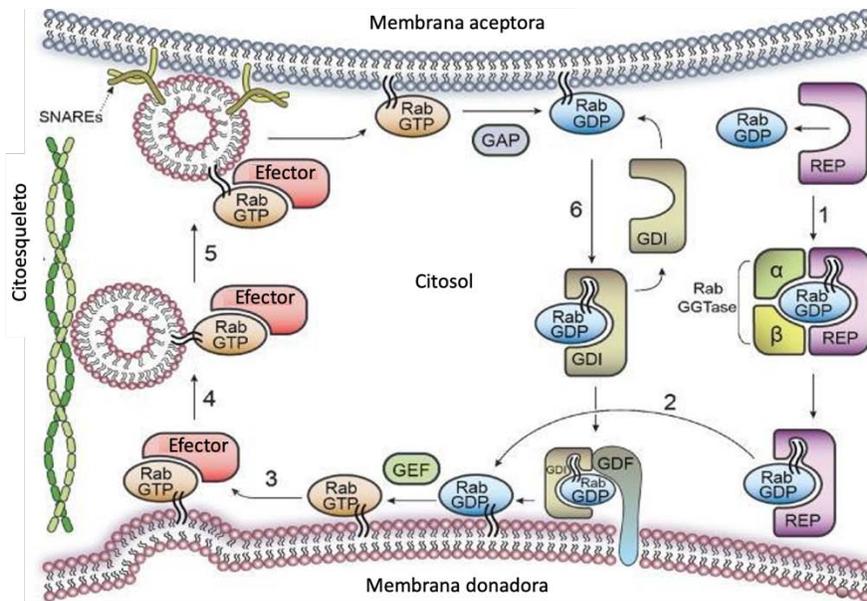


Fig. 8. Ciclo de activación de las Rab GTPasas. Después de su síntesis las Rabs se une a la proteína REP (1). La proteína REP promueve la asociación de Rab-GDP con la enzima RGGTasa que cataliza la unión del grupo geranilo. Rab-GDP-geranilo se inserta en la membrana blanco (2). El GEF modifica la Rab-GDP a Rab-GTP (3). Rab activada se une a su proteína efectora y se forma una vesícula de transporte (4). La vesícula se transporta anclada al citoesqueleto de actina hasta su membrana blanco (5). La vesícula se inserta y Rab-GTP se transforma a Rab-GDP en una reacción regulada por la proteína GAP (Tomado de ⁶⁵).

Las Rabs se encuentran en un ciclo entre el citoplasma y la membrana plasmática, el estado activo e inactivo de la Rab determina su localización y su actividad. Una vez que la Rab se traslada a su membrana blanco, se asocia con una proteína acompañante (REP), la proteína REP regula la interacción entre la Rab y la enzima Rab-geranil geranil transferasa (RabGGT), que cataliza la unión de uno o dos grupos geranilo en el extremo C- terminal de la Rab. Durante este proceso la Rab está en el estado inactivo y se inserta a la membrana de la vesícula o el organelo correspondiente ^{45,66}. Los GEFs actúan sobre la Rab que previamente

se insertó en la membrana y la convierten al estado activo sustituyendo el GDP por una molécula de GTP. Las Rabs en estado activo interacciona con sus distintos efectores ⁶⁶.

La localización y el desplazamiento de las vesículas dentro de la célula, depende de las isoformas de las Rabs que se insertan en la superficie de las vesículas o de los distintos organelos y la unión de las proteínas efectoras ⁶³ (Fig. 8). Las Rabs junto a las proteínas efectoras proporciona una “identidad” celular a las diferentes membranas. Por ejemplo: Se sabe que Rab1 y Rab2 se localizan en membranas que se transportan del retículo endoplasmático hacia Golgi, mientras que Rab4, Rab5 y Rab11 se relacionan con la internalización de endosomas tardíos ^{63,67}. Se sabe que Rab5, Rab9 y Rab11 regulan la endocitosis y el reciclaje de receptores de membrana como los GPCRs, que se internalizan en vesículas recubiertas de clatrina ^{68 69}. En la figura 9 se muestran diferentes ejemplos de las diferentes isoformas de las Rabs que dan identidad a los distintos organelos celulares.

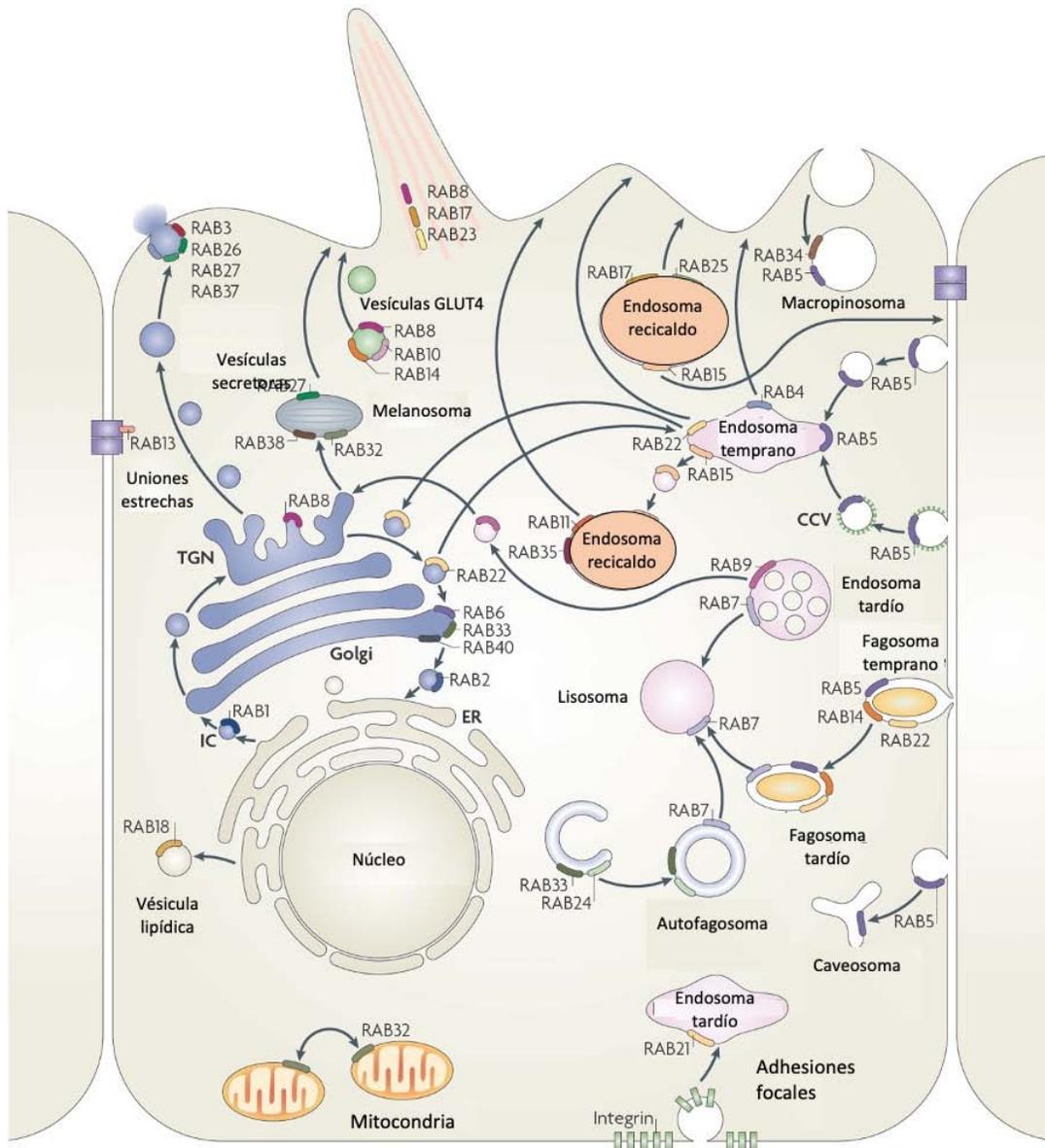


Fig. 9. Distintas Rabs GTPasas se unen a las membranas de los organelos. Las Rabs GTPasas conducen diferentes tipos de endosomas hacia los organelos (Tomado de ⁷⁰).

De manera particular la Rab11 (~25 kDa) regula varios procesos que involucran el tráfico vesicular, incluyendo la liberación de las proteínas de membrana a sitios especializados (por ejemplo, uniones célula-célula), la secreción de factores de crecimiento o péptidos, incluyendo interferones, citocinas, Proteínas Morfogénicas oseas (BMPs) y el receptor de transferrina ⁷¹. Recientemente se describió, que la proteína G pequeña Rab11b es necesaria

para la internalización constitutiva de PAR1, del mismo modo, la proteína G pequeña, Rab11a, es necesaria para la internalización y degradación de PAR1 activado². Tanto la internalización constitutiva de PAR1, como la internalización del receptor activado, ocurre a través de vesículas recubiertas de clatrina. Rab11a activado se une a una serie de proteínas efectoras denominadas familia de proteínas de interacción con Rabs (FIPs), que regulan el tráfico de vesículas asociadas a Rab11a ⁷².

1.10. Rab11FIP1 o Rab Coupling Protein (RCP)

La regulación del transporte endocítico por parte de las Rab GTPasas es un proceso poco entendido, uno de los mayores retos es la identificación y la caracterización de las proteínas efectoras a través de las cuáles las Rab GTPasas regulan el tráfico vesicular ^{45,67}. Se ha descrito un grupo de proteínas efectoras que interaccionan con Rab11 regulando sus función ⁶⁷, estas proteínas se denominan: familia de proteínas de interacción con Rab11 (Rab11-FIPs' o FIPs', por sus siglas en inglés). Esta familia de proteínas tiene un dominio de unión a las Rabs (RBD, por sus siglas en inglés). Existen 6 distintas FIPs de unión a Rab11, basándose en la homología de las secuencias se ha definido 3 clases de proteínas efectoras para Rab11: Las FIPS de clase 2 (FIP3 y FIP5) y clase 3 (FIP1A) poseen un dominio de unión a Ca²⁺ (EF hand) y un dominio ERM (ezrina/radixina/Moesina). Las FIPS de clase 2 y 3 se relacionan con el reciclaje de proteínas de membrana ^{45,67}. Las FIPs de clase 1 se componen de: FIP1B, FIP2 y la FIP1 o proteína de unión a Rab (RCP) (137 kDa). Las FIPS de clase 1 se ubican principalmente en endosomas de reciclaje. Las FIPs de clase 1 poseen un dominio C2 en el extremo N- terminal que permite su interacción con fosfolípidos en la membrana plasmática. De manera importante las FIPS de clase 1 poseen una o más

secuencias PEST, las cuales son sitios de corte para la proteasa dependiente de calcio, calpaína⁷³ (Fig. 10).

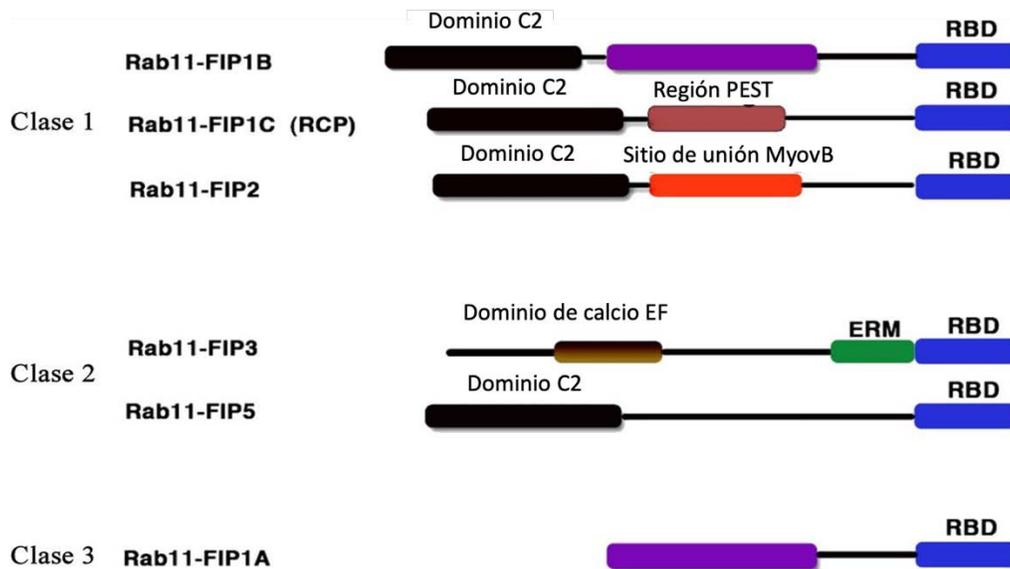


Fig. 10. Clasificación de las Rab11 FIPS. RBD (Dominio de unión a Rabs). C2 (Dominio de unión a fosfolípidos). PEST (sitio de corte de la calpaína). Myo (Dominio de unión a miosina). EF hand (Dominio de unión a Ca^{2+}). ERM (Dominio ezrina/radixina/Moesina) (Tomado de⁷³).

La Rab coupling protein (RCP) es una proteína de 80 KDa que pertenece a la clase I de proteínas que interaccionan con las Rabs (Rab11-FIP1). RCP se asocia a membranas debido a que posee un dominio C2 homólogo en su extremo N-terminal. RCP también posee un dominio de unión a Rab (RBD) en su extremo C-terminal (Fig. 11). Se sabe que Rab4, Rab11 y Rab5 son proteínas que interactúan con RCP a través de su dominio RBD. Los dominios C2 de RCP dirigen esta proteína a sitios de unión en la membrana plasmática. Esto debido a la interacción del dominio C2 con regiones ricas en fosfatidilinositol-(3,4,5)-trifosfato y

ácido fosfatídico ⁷⁴. De manera muy importante la RCP posee tres dominios PEST (Pro, Glu, Ser/Thrn), que inician en los aminoácidos 182, 249 y 336 de su secuencia. Dicho dominio, como se mencionó anteriormente, es sustrato de la calpaína, una proteasa dependiente de calcio ⁷³.

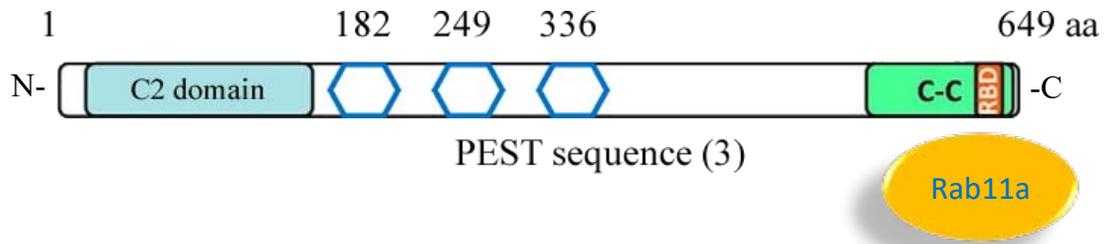


Fig. 11. Esquema de la proteína RCP (Tomado de ⁷⁴).

La inhibición de las calpaínas promueve una acumulación de la RCP en la membrana, este efecto se traduce como una disminución en la internalización de proteínas de membrana y como un aumento en la cantidad de vesículas dirigidas a la membrana ⁷³. La inhibición de RCP se relaciona con una disminución en el reciclaje del receptor de transferrina (TfnR) ⁷⁵ y del receptor de quimiocinas (CXCR2) ⁷⁶. La RCP regula la internalización del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR) ⁷⁷ y del transportador de norepinefrina (NET) ⁷⁸. La inhibición de la RCP también se relaciona con el reciclaje de TfnR ⁷⁵ y con la internalización de la integrina $\beta 1$ durante el crecimiento axonal ⁷⁹. Tanto el complejo Rab11-RCP como Rab11-FIP2 rescatan a las distintas proteínas globulares de dirigirse a lisosoma y degradarse posteriormente. Estos datos demuestran la importancia de la proteína RCP en la endocitosis de receptores de membrana.

2. Planteamiento del problema.

Se sabe que la trombina se relaciona con enfermedades fibroproliferativas de la retina, como la vitreorretinopatía proliferativa (VRP). La trombina actúa a través de los receptores activados por proteasa (PARs), por lo tanto, el estudio y análisis del funcionamiento de estos receptores es fundamental para entender el desarrollo de la VRP. La activación, internalización y posterior degradación de PAR1 es esencial para detener la señalización del receptor. En el presente estudio planteamos esclarecer los mecanismos que regulan la internalización de PAR1 y su relación con la activación de la calpaína, usando como modelo a las células ARPE-19, una línea celular derivada del EPR de humano. Además de esclarecer si la internalización de PAR1 se relaciona con la activación de la calpaína, en este trabajo pretendemos analizar más a fondo la regulación que existe en el tráfico de PAR1 hacia lisosomas. Datos previos demostraron que la Rab GTPasa Rab11a se relaciona con la internalización de PAR1. Por otro lado, se sabe que la calpaína regula la actividad de una familia de proteínas conocida como efectoras de Rab11 (FIPs), relacionadas con la internalización de proteínas de membrana. La proteína RCP es sustrato de la calpaína y su proteólisis regula la endocitosis y el reciclaje de receptores de membrana.

Con estos antecedentes y dada la naturaleza irreversible de la activación del receptor PAR1, en este trabajo planteamos la posibilidad de que la activación de la calpaína por la trombina regule la internalización de PAR1 y proponemos un mecanismo que depende de la degradación de la α -espectrina y el desensamble del complejo Rab11a-RCP, lo cual repercute en la terminación de la señalización de PAR1 y su posterior degradación en lisosomas.

Consideramos que la identificación y caracterización de los procesos moleculares que desencadena la trombina en células del EPR genera información valiosa para la prevención y el desarrollo de nuevas terapias para el tratamiento de trastornos fibroproliferativos de la retina.

3. Hipótesis

La activación de PAR1 por la trombina, generará un aumento en la concentración intracelular de calcio lo cual activará a la calpaína, que inducirá la degradación de la α -espectrina y el desensamble del complejo Rab11a/RCP, estos mecanismos repercutirán directamente en la internalización de PAR1 en células derivadas del EPR.

4. Objetivos

Objetivo general

Analizar los mecanismos que regulan la internalización de PAR1 activado en células del epitelio pigmentado de la retina.

Objetivos particulares

1. Caracterizar el incremento intracelular de Ca^{2+} promovido por la trombina.
2. Analizar el efecto de la trombina y los agonistas de los PAR's sobre la activación de la calpaína
3. Identificar la participación de la calpaína sobre la degradación de la α -espectrina durante la internalización de PAR1
4. Analizar la participación de la calpaína sobre la expresión de los PAR's en la membrana extracelular
5. Analizar la activación de la calpaína dada por trombina sobre la degradación de la proteína acoplada a Rabs RCP
6. Analizar la activación de la calpaína dada por trombina sobre la interacción del complejo Rab11a/RCP y su posible desensamble
7. Analizar si el desensamble del complejo RCP/Rab11a se relaciona con la internalización de PAR1.

5. Materiales y Métodos

5.1. Cultivo celular

Se usaron células ARPE-19, células del epitelio pigmentado de la retina derivadas de humano, inmortalizadas espontáneamente (ATCC CRL-2302, VA, EU). Se sembraron en medio DMEM/F12 suplementado con antibióticos (0.005% de penicilina-estreptomicina, 0.0025% neomicina) y suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB)⁸⁰. Para reducir resultados promovidos por el cambio del fenotipo, las células se usaron antes del pasaje 30 como se indica en la información del proveedor. En todos los experimentos las células se privaron de suero durante 24 h.

5.2. Calcio intracelular

La concentración intracelular de Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) se determinó mediante microscopía de fluorescencia. Las células se sembraron en cubreobjetos de vidrio, se incubaron con 2 μ M de fluo-4 AM, durante 35 minutos a temperatura ambiente en buffer Krebs-Ringer-Bicarbonato (KRB); (NaCl 118 mM; KH₂PO₄ 2 mM; KCl 4.7 mM; CaCl₂ 2.5 mM; MgSO₄ 1.4 mM; NaHCO₃ 25 mM; Glucosa 5.6 mM; pH 7.4). Los cubreobjetos se colocaron en una cámara de grabación (Mod. RC-25; Warner Instruments, Hamden, CT, EE. UU.) unida a la platina de un microscopio vertical (Nikon Eclipse 80i; Nikon Corp., Tokio, Japón) y se superfundieron continuamente (3 ml/min) con KRB. El Fluo-4 se excitó a 488 nm con luz monocromática de un láser de argón acoplado a un cabezal de exploración confocal de disco giratorio. La luz de emisión se capturó con un filtro de 510 nm. Las imágenes de fluorescencia se obtuvieron con un objetivo de inmersión en agua, Nikon (20x, 0,5 NA) y una cámara CCD digital enfriada (Andor Technology iXon 897, Oxford Instruments, High Wycombe, Reino

Unido) controlada por el software iQ (Andor iQ versión 1.10. 2). Las imágenes de fluorescencia se adquirieron a una exposición de 10 ms y a intervalos de 500 ms. Todos los experimentos de imagen intracelular de Ca^{2+} se realizaron a temperatura ambiente (22-24 ° C). Las secuencias de imágenes se analizaron utilizando el software Image J (National Institutes of Health). Los valores obtenidos se expresan como Unidades de fluorescencia arbitraria (AFU). El área bajo cada curva (AUC) se calculó utilizando el software GraphPad PRISM 6.0 (La Jolla, CA, EE. UU.). Para aquellos experimentos realizados en ausencia de Ca^{2+} , las células se perfundieron con KRB libre de Ca^{2+} ; suplementado con 0.25 mM EGTA o 100 μM LaCl_3 . Las células se estimularon con 10 nM de trombina o con los péptidos agonistas de PAR1 (2.5 μM), PAR2 (25 μM), PAR3 (25 μM) o PAR4 (25 μM).

5.3. Activación de μ y m calpaínas

Se utilizó el kit Calpain-Glo Protease Assay (Promega, Madison, WI, EE. UU.) para determinar la actividad de m y μ calpaína. Las células se incubaron durante 30 minutos con epoxomicina 100 nM para inhibir la actividad del proteosoma. Los cultivos se lavaron con solución salina de fosfatos (PBS 1x) y se incubaron durante una hora con el péptido sustrato de la calpaína Suc-LLVY diluido con buffer Calpain-Glo a 37 ° C. Las células se lavaron con PBS 1x para eliminar el péptido no incorporado y posteriormente se estimularon con trombina o con los péptidos agonistas de los PARS en medio DMEM/F12 a temperatura ambiente durante 1 minuto. Las células se permeabilizaron usando 0.9% de Triton X-100 en PBS. Se añadió reactivo de detección de luciferina (Promega, Madison, WI, EE. UU.). Se midió la actividad durante 5 minutos y se midió la luminiscencia en un lector de placas

(Synergy HT, BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, EE. UU.). Los resultados se expresan como porcentaje de unidades de luminiscencia relativa (% RLU).

5.4. Western blot

Las células ARPE19 se sembraron en cajas de 6 pozos. Se privaron de suero 24 h antes del experimento. Se lisaron las muestras con 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 1% CHAPS, 0.5% NP40, 0.1% BSA, 10% y P8340 inhibidor de proteasas. Las muestras se solubilizaron en buffer Laemmli 0.75mM Tris- HCl; pH 8.8, 5% SDS, 20% glycerol, 0.01% de azul de bromofenol, 10% β -mercaptoethanol. Se hirvieron las muestras durante 5min. Se determinó proteína usando el método del ácido bicínico. Se corrieron 30 μ g de proteína en geles de acrilamida al 7% y se transfirió a membranas de nitrocelulosa. Se bloquearon las membranas con leche al 7.5% durante 1 h. Se incubaron los anticuerpos primarios anti-espectrina 1:4000, anti-RCP 1:5,000, anti-Rab11a 1:1,000, en todos los casos se incubó durante toda la noche en cuarto frío. Se incubaron los anticuerpos secundarios acoplado a HRP en una dilución 1:10,000. Se analizaron los datos de densitometría con el software libre Fiji. Los resultados se expresan como porcentaje comparado contra el control negativo.

5.5. Inmunocitoquímica

Se sembraron las células sobre cubreobjetos de 22 mm. Se privaron de suero 24h antes del experimento. Se bloqueó con Suero Fetal Bovino (BSA) 1% durante 1 h a temperatura ambiente. Se incubó el anticuerpo primario α -mouse anti-PAR1 (Santa Cruz) en una dilución de 1:500. El anticuerpo secundario anti-mouse acoplado a CY5 se incubó en una dilución

1:10,000. Se tiñeron los núcleos con Hoechst 1x durante 15 min. En los experimentos correspondientes se transfectó 50 pm de siRNA-RCP y 50 pm de siRNA-Rab11a usando Lipofectamine RNAiMax durante 24 h. Las imágenes se obtuvieron en un microscopio Nikon (Eclipse TE 2000-U) con el software ACT-1. Se usó un objetivo 40x con una apertura numérica de 0.6. Los datos se expresan como la Fluorescencia Total Corregida (CTCF), la cual se calculó usando el software libre Fiji.

5.6. Citometría de flujo

Para evaluar la repercusión de la proteólisis de RCP sobre la internalización de PAR1, se sembraron células en cajas de 10 cm. Se usaron células sin estimular como control negativo y células estimuladas con trombina como control positivo. Se analizó el efecto de la trombina en células que sobre expresen la proteína RCP y en células en las que se use un RNAi dirigido contra RCP. Se despegaron las células de la caja con 10% de EDTA y se pusieron ~500,000 células en tubos eppendorf, resuspendidas en medio DMEM/F12 sin suero. Se incubó a las células no permeabilizadas con un anticuerpo anti-PAR1 acoplado al fluoróforo Alexa-488. Se midió la fluorescencia en un citómetro de flujo atunne NXT de enfoque por sonido. Se usó el software Flowjo para analizar los datos. Como control de auto fluorescencia se usaron células sin marcar.

5.7. Inmunoprecipitación

Para evaluar la interacción entre RCP y Rab11a, se sembraron las células en cajas de 10 cm. Se analizó el efecto de la estimulación con 2 U/ml de trombina. Se lisaron las células con un buffer de lisis para condiciones no desnaturizantes in 20 mM Tris-HCl; pH 8, 137 mM NaCl, 1% NP-40, 2 mM EDTA y se incubaron 700 µg del lisado con células de sefarosa G

previamente incubadas con el AB anti-RCP (2 μ l) o anti-Rab11a (2 μ l). Se separaron las proteínas por electroforesis en geles de acrilamida al 7%. Se transfirieron las proteínas a membranas de nitrocelulosa y se hizo el inmunoblot revelando contra RCP (1:5,000) o Rab11a (1:2,000) para evaluar la interacción de dichas proteínas. Se analizaron los datos mediante densitometría usando el software Fiji. Los datos se expresan como el porcentaje de relación entre Rab11a/RCP o RCP/Rab11a comparado contra los controles negativos.

5.8. FRET

Para determinar la interacción y posible participación del complejo Rab11a/RCP sobre la internalización de PAR1 se sembraron las células en cubreobjetos de 12 mm. Se transfectaron las células con Lipofectamina LTX & plus reagent durante 16 h con los plásmidos RCP-YFP y Rab11a-CFP⁸¹. Después de 48 h las muestras se fijaron con 4% de paraformaldehído a temperatura ambiente durante 12 min. Se obtuvieron las imágenes de FRET mediante microscopía confocal, en un microscopio LSM800 usando el software ZEN (Zeiss, Jena, Alemania) con un objetivo 63x de inmersión en aceite. Se capturaron imágenes con una apertura del “pinhole” de 1.0. Se excitaron las muestras solo con el láser de 405 nm y se captó la fluorescencia para CFP y YFP. Se hicieron controles con células que solo se transfectaron con uno de los plásmidos. Se analizaron los datos usando el plugin FRET and Colocalization Analyzer diseñado para el software de código abierto Fiji ⁸².

5.9. Microscopía confocal

Para validar la co-localización de PAR1-LAMP1 tratamos las células como mencionamos en la sección de inmunquímica. Sin embargo, en estos experimentos co-transfectamos células

con el plásmido LAMP1-mGFP (marcador de lisosoma) y teñimos con un anticuerpo anti-PAR1 1:500, se marcaron las células con un anticuerpo secundario Alexa-647. Obtuvimos imágenes en un microscopio LSM800 con objetivo 63x, apertura numérica 1.4. Usamos el software ZEN blue edition Carl Zeiss (Jena, Alemania) para analizar los eventos de co-localización.

5.10. Migración

Las células ARPE19 se cultivaron a un 90% de confluencia en placas de seis pocillos (Costar; Corning, Inc., Washington, DC, EE. UU.) en DMEM-F12 que contenía 10% SFB. Las células fueron privadas de suero durante 24h. Para evaluar la migración celular, las monocapas celulares se rayaron mecánicamente con una punta de pipeta dibujando dos líneas. Las monocapas rayadas se transfectaron con siRNARab11a y/o siRNA-RCP en DMEM-F12 sin suero, o se incubaron con calpastatina 50 μ M. Las células se incubaron a 37 °C en presencia de 2 U/ml de trombina. Al final del período de estimulación, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% y se examinaron visualmente mediante microscopía de contraste de fases. (Nikon Eclipse TS100). Las imágenes fueron capturadas a 0h, 24h y 48h.

5.11. Proliferación

La proliferación se determinó utilizando 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfófenil)-2H-tetrazolio Kit de ensayo (MTS) (Promega, Madison, WI, EE. UU.). Las células se incubaron en placas de cultivo de 96 pozos (Corning, Corning, NY) a una concentración de 1×10^4 células/pozo. Las células se transfectaron con siRNARab11a y/o siRNA-RCP en DMEM-F12 sin suero, o se incubaron con calpastatina 50 μ M. Las células

se incubaron durante 24h a 37 °C en presencia de 2 U/ml. trombina. Se agregaron 20 µL de MTS 5 mg/mL a cada pocillo durante 1 h. Se midió la absorbancia a 490 nm con un lector de microplacas (ELx800, Biotek, Winooski, VT, EE. UU).

5.12. Análisis estadístico

Todos los resultados se expresan como la media \pm SEM. Los datos para el análisis se obtuvieron de tres experimentos independientes. La normalidad de los datos se calculó con la suma de todas las observaciones dividida entre el número de observaciones. Posteriormente se aplicó una prueba de ANOVA de comparación múltiple y una prueba post hoc de Tukey para comparar diferentes condiciones. El análisis se realizó en GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). En los experimentos de microscopía, todas las células se analizaron en al menos diez campos elegidos al azar.

6. Resultados

6.1. La trombina y el agonista de PAR1 promueven un incremento de $[Ca^{2+}]_i$

El primer objetivo del trabajo fue caracterizar el mecanismo mediante el cual la trombina promueve un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$. Sabíamos que tanto la trombina como el péptido agonista de PAR1 (SFLLRNPNDKYEPF) incrementan la concentración de Ca^{2+} intracelular en células del EPR (Yang et al. 2015; Ngaiza and Jaffe 1991). Sin embargo, desconocíamos la concentración a la que ocurre el mayor incremento. Para determinar a qué concentración se produce el mayor incremento de Ca^{2+} intracelular, hicimos una curva dosis-respuesta tanto para la trombina como para el péptido agonista de PAR1 (Fig. 12). Las células estimuladas con concentraciones crecientes de trombina incrementaron la concentración de Ca^{2+} intracelular de manera dependiente de la dosis (Fig. 12A y 12B). Determinamos que 10 nM de trombina y 2.5 μ M del péptido agonista de PAR1 promueven el mayor incremento de Ca^{2+} intracelular en las células del EPR (Fig. 12A - 12D). La estimulación con 10 nM de trombina produjo un incremento de $\sim 38\%$ comparado contra el control negativo. Es importante mencionar que 10nM de trombina corresponde a 1.8 U/ml de trombina. Se calculó una EC50 para la trombina de 0.55 nM (Fig. 12C). Como control positivo estimulamos a las células con 10% de suero fetal bovino (SFB), esto generó un incremento de $\sim 46\%$ (Fig. 12B). Demostramos que el efecto es específico de la trombina, dado que, la estimulación con trombina en presencia de 25 μ M de PPACK, un inhibidor irreversible del sitio catalítico de la trombina (Fig. 12A y 12B), no incrementó el Ca^{2+} intracelular.

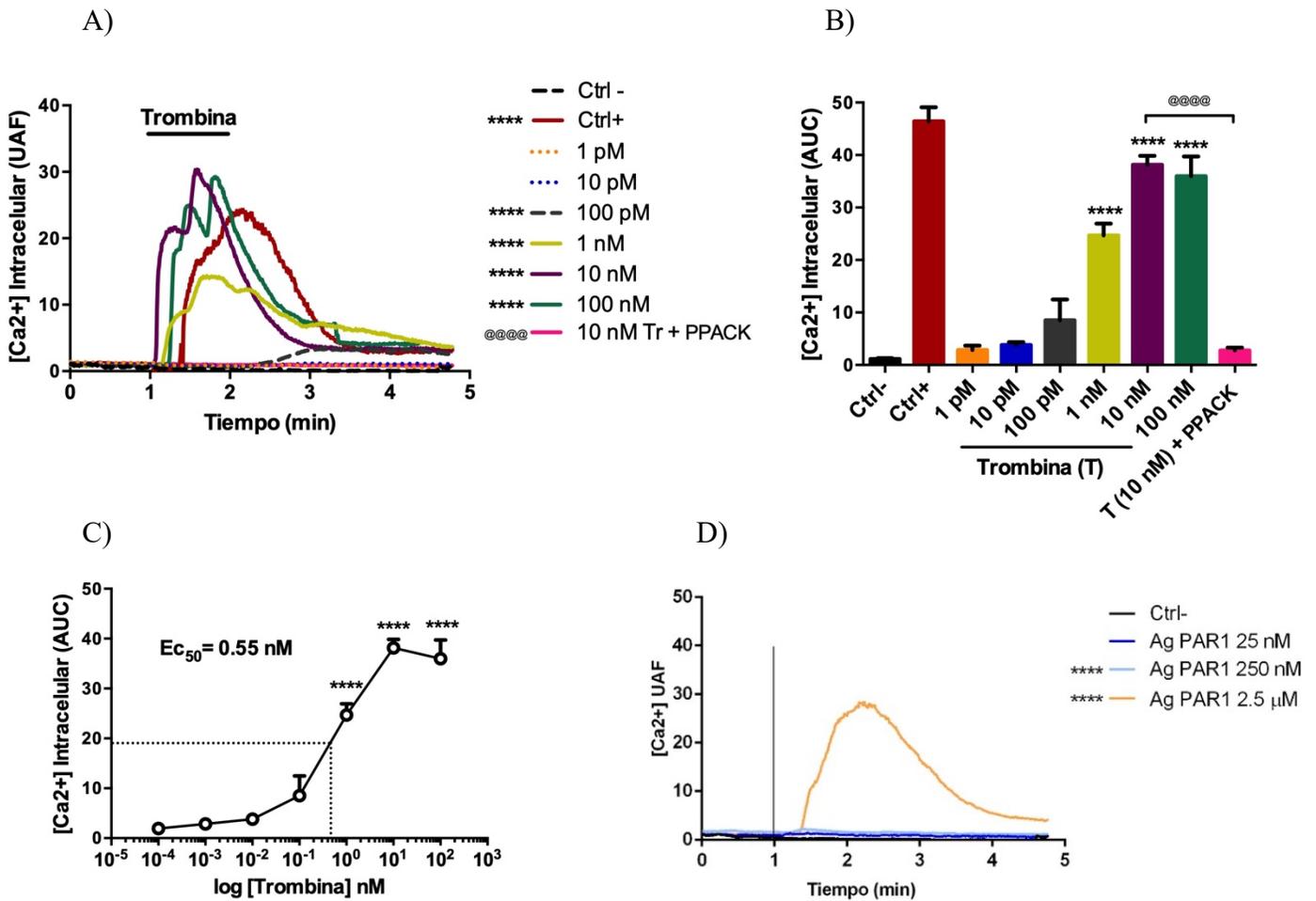


Fig. 12. La trombina y el agonista de PAR1 inducen un incremento del Ca^{2+} intracelular en células del EPR. Las células ARPE-19 sin estimular se usaron como control negativo y las células estimuladas con SFB 10% como control positivo. La concentración de Ca^{2+} se expresa como unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF) o área bajo la curva (AUC).. **A-D)** La trombina 10 nM o el agonista de PAR1 (SFLLRNPNDKYEPF) 2.5 μM induce un incremento del Ca^{2+} intracelular. El incremento del Ca^{2+} se inhibe en presencia de PPACK 25 μM . **C)** Se calculó la Ec_{50} de la trombina. Se analizaron 100-200 células por campo, de un total de 10 campos para cada condición experimental. Los valores son el promedio de 3 experimentos independientes \pm EE. Los resultados se analizaron con una prueba de ANOVA de comparación múltiple y una prueba de Turkey's con un $\alpha = 0.001$ (****). Se comparó vs 10 nM de trombina, $\alpha = 0.001$ (@@@@).

Debido a que la trombina activa a los receptores PAR3 y PAR4 (Faruqi et al. 2000), investigamos si el incremento de Ca^{2+} por efecto de la trombina se regula a través de estos receptores, para ello, estimulamos las células con los agonistas de PAR3 y PAR4. La estimulación con $25\mu\text{M}$ del agonista de PAR3 promovió un incremento estadísticamente significativo de $\sim 13\%$ comparado contra el control negativo. Sin embargo, no se observó incremento significativo en la concentración de Ca^{2+} en células estimuladas con el agonista de PAR4 (Fig. 13A y 13B).

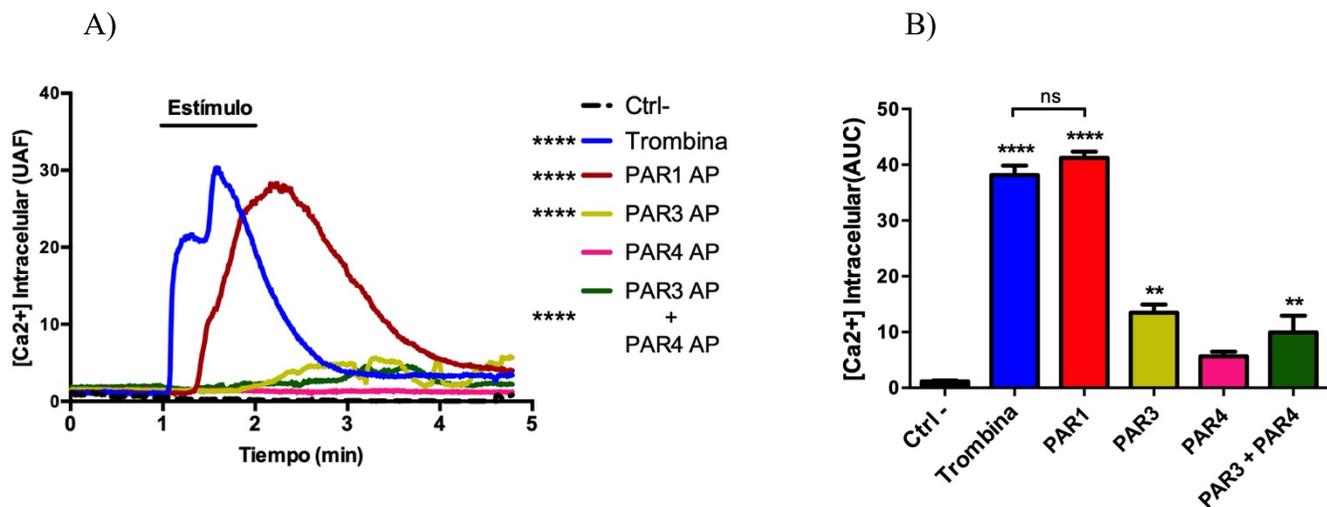


Fig. 13. El incremento del Ca^{2+} inducido por la trombina ocurre a través de PAR1 y PAR3. El control negativo fueron células sin estimular. La concentración de Ca^{2+} se expresa como unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF) o como área bajo la curva (AUC). **A)** Las células se estimularon con los agonistas de los diferentes PARs, Ag PAR1 $2.5\mu\text{M}$, Ag PAR3 $25\mu\text{M}$ y Ag PAR4 $25\mu\text{M}$. **B)** Se calculó el promedio del valor del área bajo la curva de cada registro mostrado en A. Se analizaron 100-200 células por campo, de un total de 10 campos para cada condición experimental. Los valores son el promedio de 3 experimentos independientes \pm EE. Los resultados se analizaron con una prueba de ANOVA de comparación múltiple, se aplicó una prueba de Turkey's con un $\alpha = 0.001$ (****) o un $\alpha = 0.05$ (**).

6.2. El incremento de $[Ca^{2+}]_i$ tiene un origen intracelular y extracelular

Una vez determinada la concentración de trombina y de PAR1 que promueve el mayor incremento de Ca^{2+} , nos preguntamos si el incremento de Ca^{2+} tenía un origen intracelular exclusivamente o también tenía un origen extracelular. Para determinar si el Ca^{2+} producido por la trombina o por el agonista de PAR1, tenía un origen intracelular y/o extracelular, estimulamos a las células en un medio privado de Ca^{2+} suplementado con 0.25 mM de EGTA (un quelante del Ca^{2+} extracelular). Observamos que el incremento de Ca^{2+} originado por 10 nM de trombina y 2.5 μ M del agonista de PAR1 se reduce en presencia de 0.25 mM de EGTA, ~22-25% de lo observado en presencia de un medio con 2 mM de Ca^{2+} sin EGTA para ambos casos (Fig. 14A y 14C). De esta manera determinamos que ~80% del incremento del Ca^{2+} intracelular promovido por la trombina y por el agonista de PAR1, proviene de pozas endógenas y ~20% proviene del exterior de la célula. Para corroborar lo anterior estimulamos a las células con 10 nM de trombina y con 2.5 μ M del agonista de PAR1 en presencia de 100 μ M de $LaCl_3$ (un inhibidor de los canales TRPC y Orai) ⁸³. Observamos que la respuesta es similar a lo que ocurre en presencia de EGTA, la inhibición de los canales transportadores de Ca^{2+} en la membrana plasmática, impide el paso de Ca^{2+} del exterior de la célula (Fig. 14B y 14D). Estos datos en conjunto nos permitieron corroborar que el ~20% del incremento de Ca^{2+} promovido por la trombina y el agonista de PAR1 proviene del exterior celular, mientras que el ~80% del Ca^{2+} proviene de las pozas endógenas del RE. Para asegurarnos que el ~80% del Ca^{2+} provenía de pozas endógenas estimulamos las células con trombina en presencia de 0.25 mM de EGTA y 2 μ M de taspigargina, como se esperaba, las células estimuladas con trombina y el agonista de PAR1 no presentaron incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular (Fig. 14A y 14C).

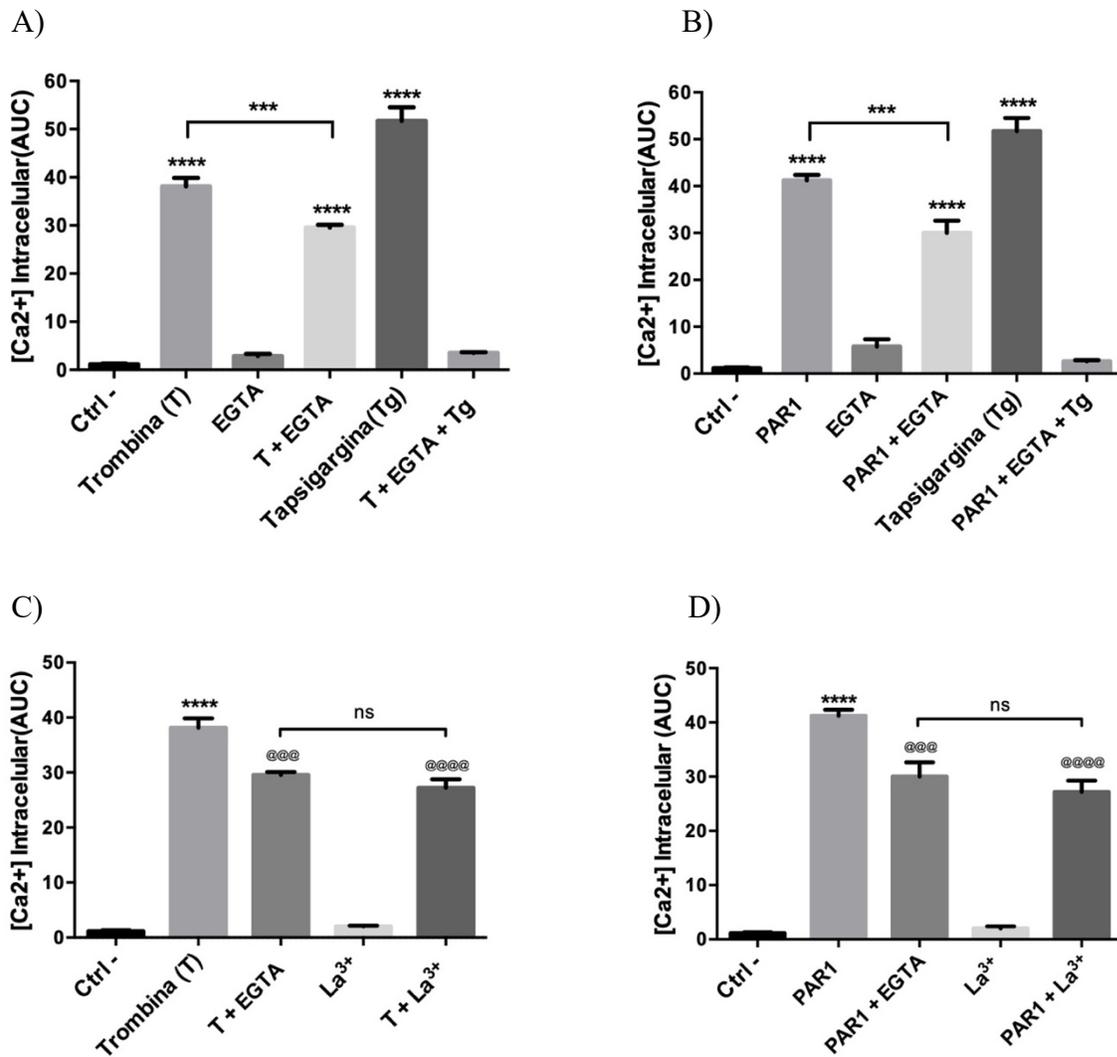


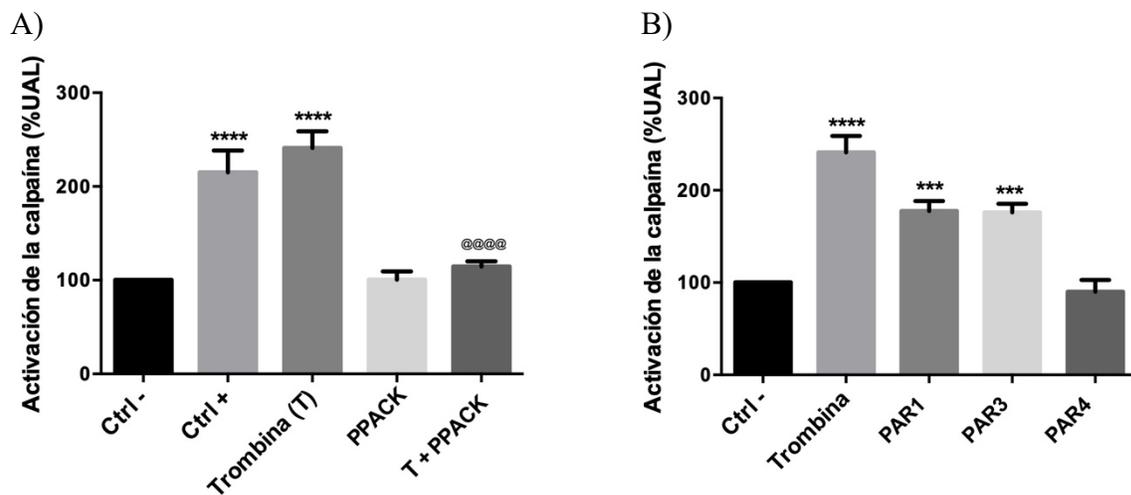
Fig. 14. El incremento del Ca^{2+} inducido por la trombina y el agonista de PAR1 tiene origen intracelular. El control negativo fueron células sin estimular. La concentración de Ca^{2+} se expresan como área bajo la curva (AUC). **A-C)** El efecto causado por la trombina se inhibe en células pretratadas con EGTA 0.25 mM y tapsigargina 2 μM . El mismo fenómeno se observa en células estimulada con 2.5 μM del agonista de PAR1. **B-D)** Las células se estimularon en presencia de LaCl_3 100 μM . Se analizaron 100-200 células por campo, de un total de 10 campos para cada condición experimental. Los valores graficados son el promedio de 3 experimentos independientes \pm EE. Los resultados se analizaron con una prueba de ANOVA de comparación múltiple y una posterior prueba de Turkey's

6.3. La trombina y el agonista de PAR1 activan a la calpaína

Después de demostrar que tanto la trombina como el agonista de PAR1 incrementan el Ca^{2+} intracelular en células del EPR, nos preguntamos si este incremento promovía la activación de la calpaína, una proteasa dependiente del incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular. Para ello usamos una técnica de bioquimioluminiscencia, que consiste en la degradación de un péptido sustrato de la calpaína Suc-LLVY⁸⁴, esto permite medir de manera simultánea la activación de las isoformas μ y m . Estimulamos a las células con 10 nM de trombina y con 2.5 μM del agonista de PAR1, determinamos que tanto la trombina como el agonista de PAR1 activan a la μ - m calpaína $\sim 250\%$ y $\sim 170\%$ respectivamente. Como control positivo estimulamos con 10% de SFB y se observó un incremento de $\sim 185\%$ (Fig. 15A y 15B). Demostramos que el efecto es específico de la trombina, pues la estimulación con 10 nM de trombina en presencia de 25 mM de PPACK no activa a la μ - m calpaína. Debido a que observamos que el péptido agonista de PAR3 incrementa la concentración de Ca^{2+} intracelular (Fig. 13A y 13B), estimulamos a las células con los péptidos agonistas de PAR3 y PAR4. Observamos que el péptido agonista de PAR3 genera una activación de la calpaína de $\sim 176\%$, comparado contra el control negativo. La activación de la μ - m calpaína no ocurre en presencia del péptido agonista de PAR4 (Fig. 15B).

Para investigar si la activación de la calpaína por efecto de la trombina, depende del incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular, estimulamos a las células con trombina en presencia de 10 μM de BAPTA-AM (un quelante del Ca^{2+} intracelular), en estas condiciones no observamos la activación de la calpaína (Fig. 15C), lo que nos permitió determinar que la activación de la calpaína por efecto de la trombina depende del incremento

en la concentración de Ca^{2+} intracelular. Finalmente observamos que la trombina no promueve la activación de la calpaína en presencia de inhibidores de la calpaína, tanto en presencia de $1\mu\text{M}$ de calpastatina (el inhibidor endógeno de la calpaína) como en presencia de $100\mu\text{M}$ de PD150606 (un inhibidor sintético de la calpaína). Contrario a ello, la activación de la calpaína se reduce a $\sim 35\%$ y $\sim 36\%$ respectivamente, por debajo del control negativo (Fig. 15C). Los datos en conjunto sugieren que la trombina y el agonista de PAR1 activan a la $\mu\text{-m}$ calpaína y que dicha activación depende del incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular. Sin embargo, el agonista de PAR3 también promueve la activación de la $\mu\text{-m}$ calpaína.



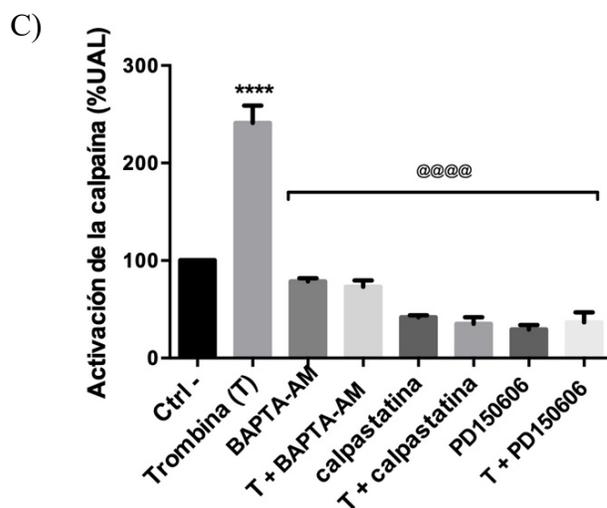


Fig. 15. La trombina y los agonistas de los PARs activan a las isoformas μ y m de la calpaína. El control negativo fueron células sin estimular y el control positivo células estimuladas con SFB 10%. La activación de las isoformas μ y m de la calpaína se expresa como el porcentaje de unidades arbitrarias de luminiscencia (%UAL). **A)** Se estimuló con trombina 10 nM en presencia de PPACK (25 μ M). **B)** Se estimuló con PAR1 2.5 μ M, PAR3 25 μ M, y PAR4 25 μ M. **C)** Se queló el Ca^{2+} intracelular usando BAPTA-AM 10 μ M. Se estimuló en presencia de calpastatina 1 μ M y PD150606 100 μ M. Los experimentos se hicieron en placasa de 96 pozos por triplicado. Los valores graficados son el promedio de 3 experimentos independientes \pm EE. Los resultados se analizaron con una prueba de ANOVA de comparación múltiple y una posterior prueba de Turkey's con un $\alpha = 0.001$ (****) o un $\alpha = 0.01$ (**). Se comparó con el grupo tratado con trombina (10 nM), $\alpha = 0.001$ (@@@@).

6.4 La activación de la calpaína promueve la degradación de la α -espectrina

Demostramos que la trombina y los agonistas de PAR1 y PAR3 promueven la activación de las dos isoformas de la calpaína (μ -m calpaína). Sin embargo, dicha técnica no permite distinguir entre la activación de una u otra isoforma. Por lo tanto, nos preguntamos si la estimulación con trombina y con los agonistas de PAR1 y PAR3 activaba de manera preferencial a alguna de las dos isoformas de la calpaína. Para ello, usamos una técnica que

permite medir la activación de una sola de las isoformas de la calpaína, la μ -calpaína. Medimos la degradación de la proteína α -espectrina (~ 250 kDa), la degradación de la α -espectrina, además, se relaciona con la internalización de proteínas de membrana ⁵⁸. Dicha degradación es propiciada por la activación de la μ -calpaína (únicamente) y el producto son dos fragmentos de menor tamaño (~ 150 kDa y ~ 120 kDa). En primer lugar, observamos que las células estimuladas con 10 nM de trombina presentaban un incremento de $\sim 233\%$, de la degradación de la α -espectrina, lo que se traduce como la activación de la μ -calpaína, esto comparado contra las células sin estimular. Demostramos que el efecto es específico de la trombina, dado que en presencia de 25 μ M de PPACK no se observa la formación de dichos fragmentos (Fig. 16A). Por otro lado, demostramos que las células estimuladas con 2.5 μ M del agonista de PAR1 presentaban un incremento en la activación de la μ -calpaína de $\sim 178\%$. Sin embargo, las células estimuladas con 25 μ M del agonista de PAR3 y 25 μ M del agonista de PAR4 se mantuvieron similares al control negativo, es decir, no se observó el efecto de la activación de la isoforma μ -calpaína (Fig. 16B). Demostramos que el efecto de activación de la μ -calpaína y la posterior degradación de la α -espectrina, depende del incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular por efecto de la trombina y el agonista de PAR1, debido a que no se observa la degradación de la α -espectrina en células estimuladas con 10 nM de trombina presencia de 10 μ M de BAPTA-AM (Fig. 16C). Del mismo modo, no se observa la degradación de la α -espectrina en las células estimuladas con 10 nM de trombina en presencia de inhibidores de la calpaína (1 μ M de calpastatina y 100 μ M de PD150606) (Fig. 16C). Los datos en conjunto sugieren que la trombina activa a la isoforma μ -calpaína a través de PAR1 y que dicha activación depende del incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular.

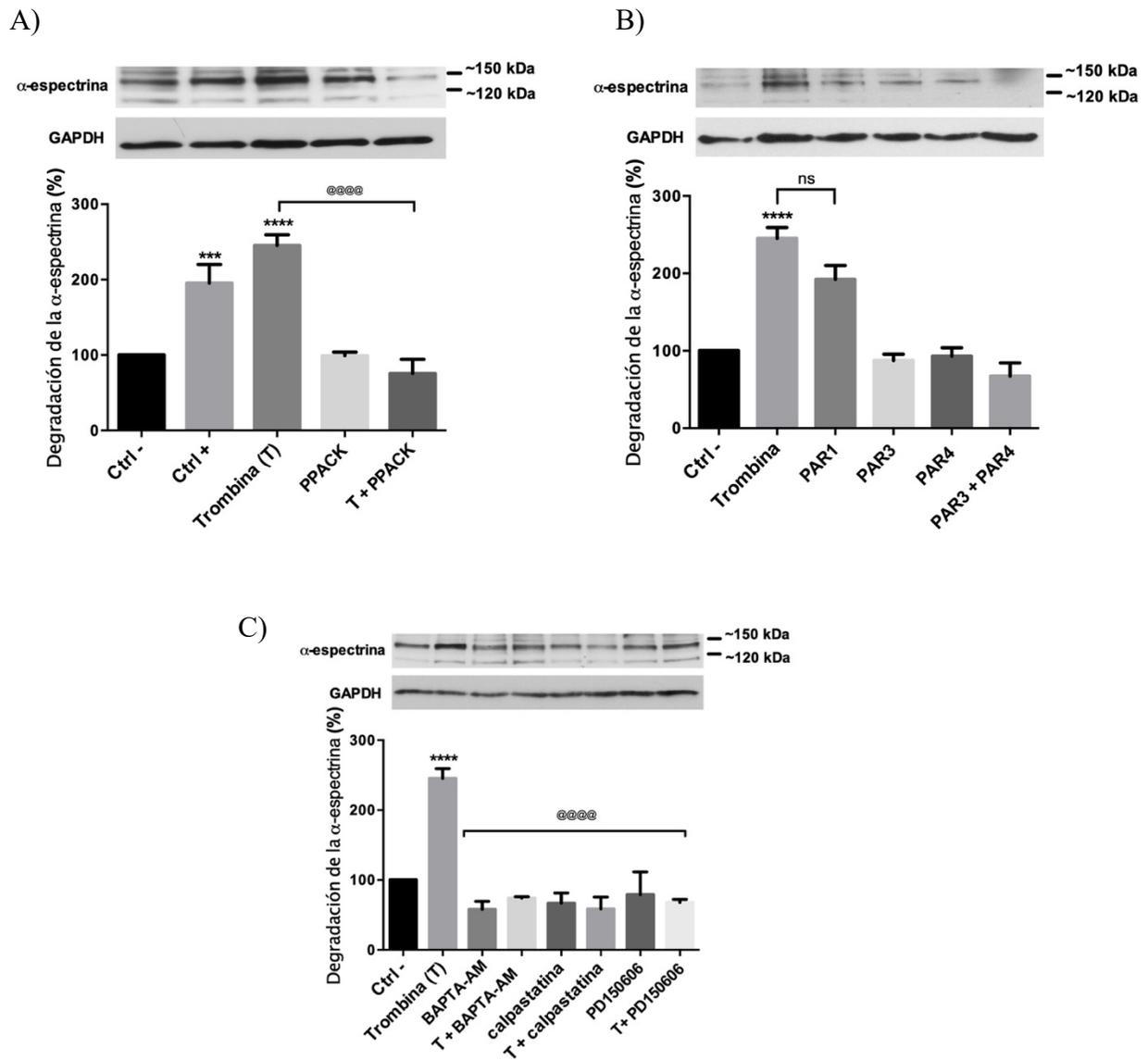


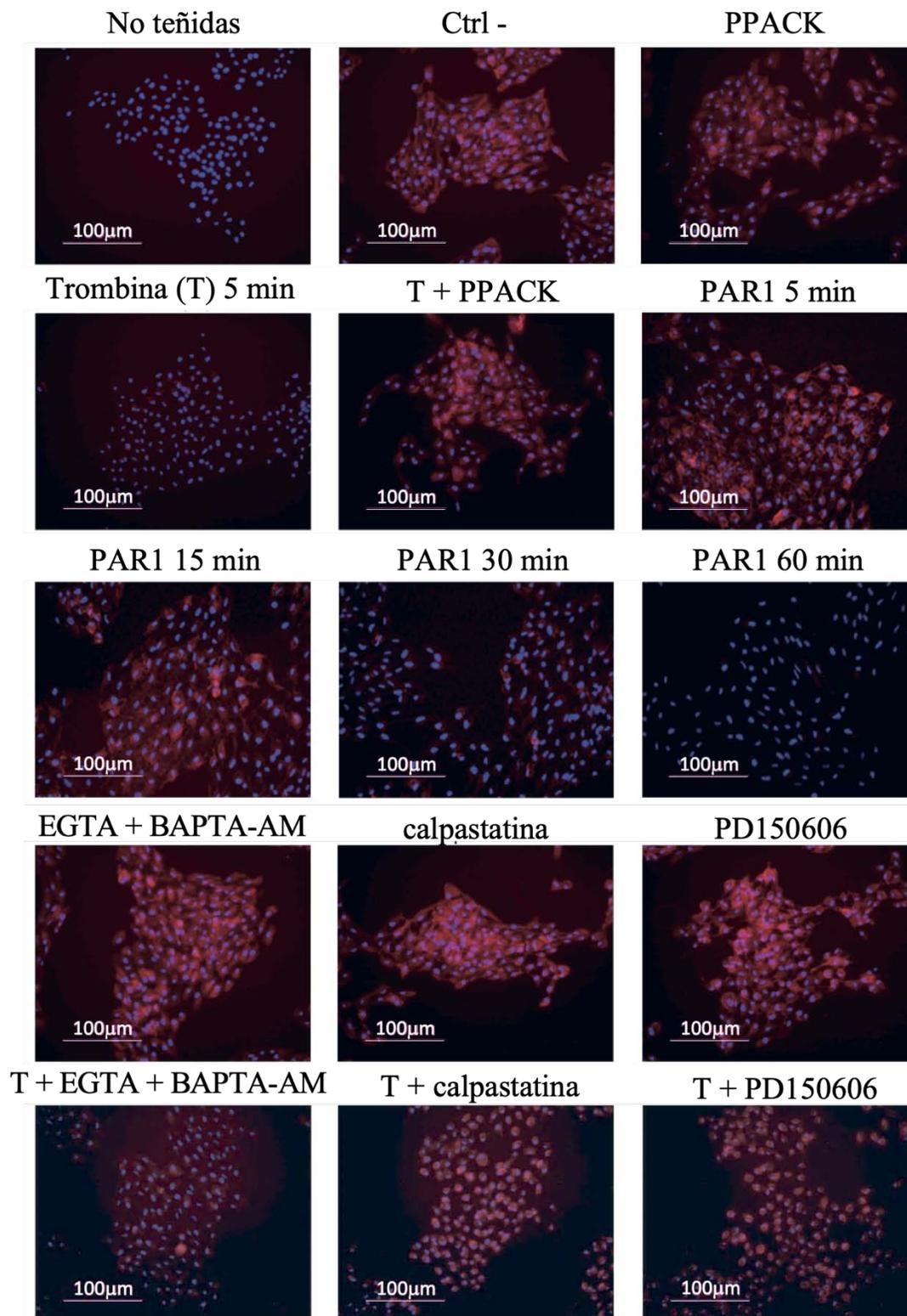
Fig. 16. La trombina activa a la μ -calpaína a través de PAR1. El control negativo fueron células sin estimular. El control positivo fueron células estimuladas con SFB (10%). La proteólisis de la α -espectrina se expresan como porcentaje comparado contra el control negativo A) Se estimuló a las células con trombina 10 nM en presencia de PAPACK 25 μ M. B) Se estimuló con los agonistas de los PARs: Ag PAR1 2.5 μ M, Ag PAR3 25 μ M y Ag PAR4 25 μ M. C) Se queló el Ca^{2+} con BAPTA-AM 10 μ M. Se inhibió a la calpaína con calpastatina 1 μ M y PD150606 100 μ M. Los valores graficados son el promedio de 3 experimentos independientes \pm SEM. Los resultados se analizaron con una prueba de ANOVA de comparación múltiple y una posterior prueba de Turkey's.

6.5 La calpaína regula la expresión de PAR1 en la membrana

Previamente mostramos que tanto la trombina como el agonista de PAR1 promueven un incremento en la concentración del Ca^{2+} intracelular y que dicho incremento activa a la isoforma μ -calpaína mediante un mecanismo dependiente de Ca^{2+} . En este contexto, nos plantemos esclarecer si la activación de la calpaína se relaciona con la internalización del receptor PAR1. Medimos la presencia del receptor PAR1 en la membrana mediante microscopía de fluorescencia (Fig. 17) y citometría de flujo (Fig, 18). Observamos que la presencia de PAR1 en la membrana disminuye completamente en las células estimuladas con 10 nM de trombina y con el agonista de PAR1, sin embargo, el agonista de PAR1 requiere de un mayor tiempo de estimulación para generar los mismos resultados que los observado con trombina.

Por otro lado, demostramos que la internalización del receptor PAR1 es un mecanismo que depende del incremento de la concentración de Ca^{2+} y la posterior activación de la calpaína. Observamos que ~50% del receptor PAR1 se mantiene en la membrana de las células estimuladas con 10 nM de trombina en presencia de 10 μM de BAPTA-AM. Del mismo modo, ~70-80% del receptor PAR1 se mantiene en la membrana de las células tratadas con 10 nM de trombina en presencia de inhibidores de la calpaína (1 mM de calpastatina y 100 mM de PD150606). Los datos indican que la activación de la calpaína es necesaria para la internalización de PAR1 y que dicha activación se promueve por el incremento del Ca^{2+} intracelular promovido por la trombina (Fig. 17 y 18).

A)



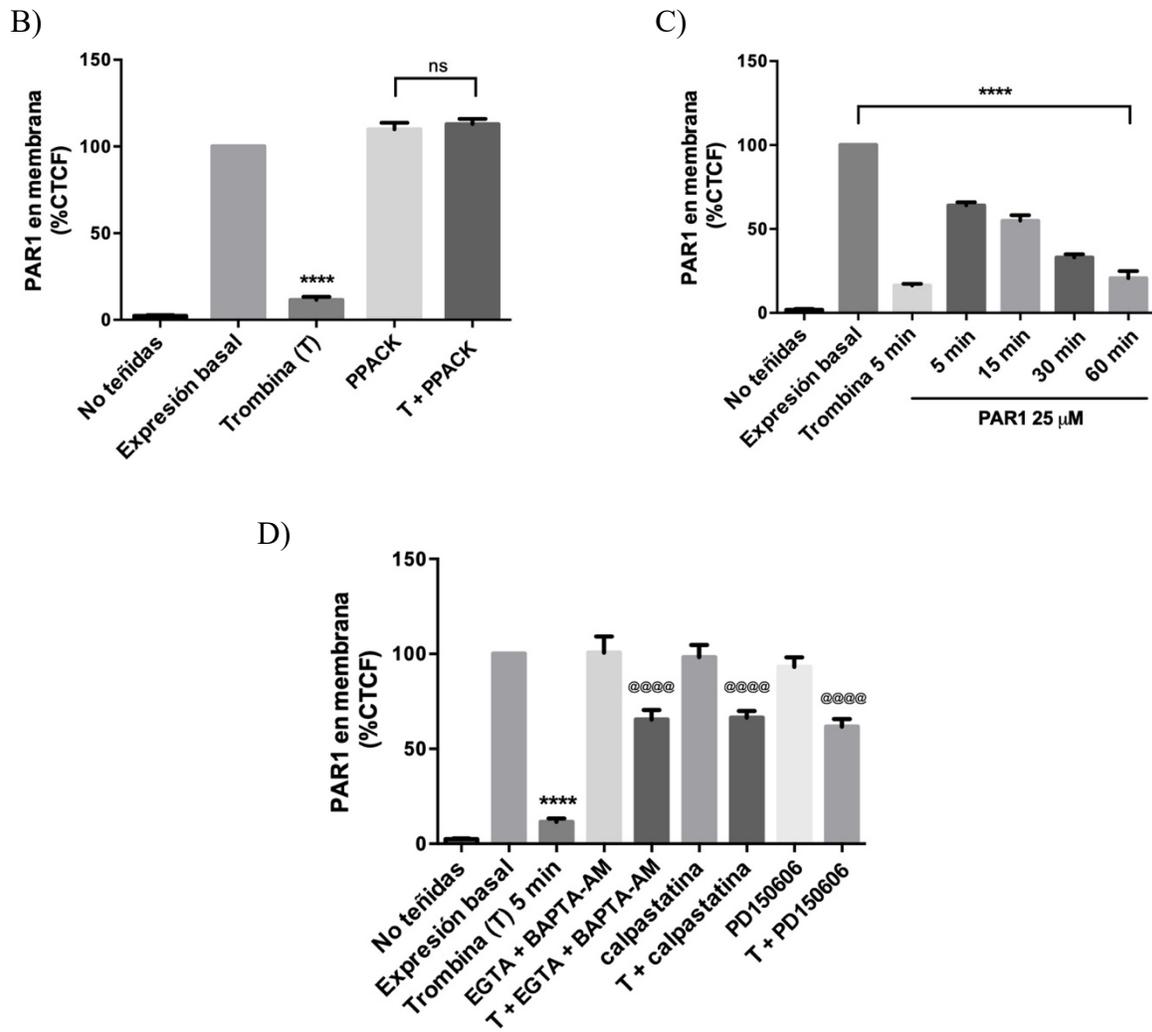


Fig. 17. La calpaína se relaciona con la expresión de PAR1 en la membrana. Se midió la expresión de PAR1 usando microscopía de epifluorescencia. **A-C)** La trombina 10 nM y el agonista de PAR1 2.5 μ M disminuye la expresión de PAR1 en la membrana. **D)** Se estimuló con trombina en presencia de PPACK 25 μ M, calpastatina 1 μ M y PD150606 100 μ M. Se analizaron 100-200 células por campo, de un total de 10 campos para cada condición experimental. Los valores graficados son el promedio de 3 experimentos independientes \pm EE. Se analizaron 100-200 células por campo, de un total de 4 campos para cada condición experimental. Los resultados se analizaron con una prueba de ANOVA de comparación múltiple y una posterior prueba de Turkey's con un $\alpha = 0.001$ (****), $\alpha = 0.01$ (***) o no significativo (ns). Se comparó contra el grupo tratado con trombina (10 nM) con un $\alpha = 0.001$ (@@@@).

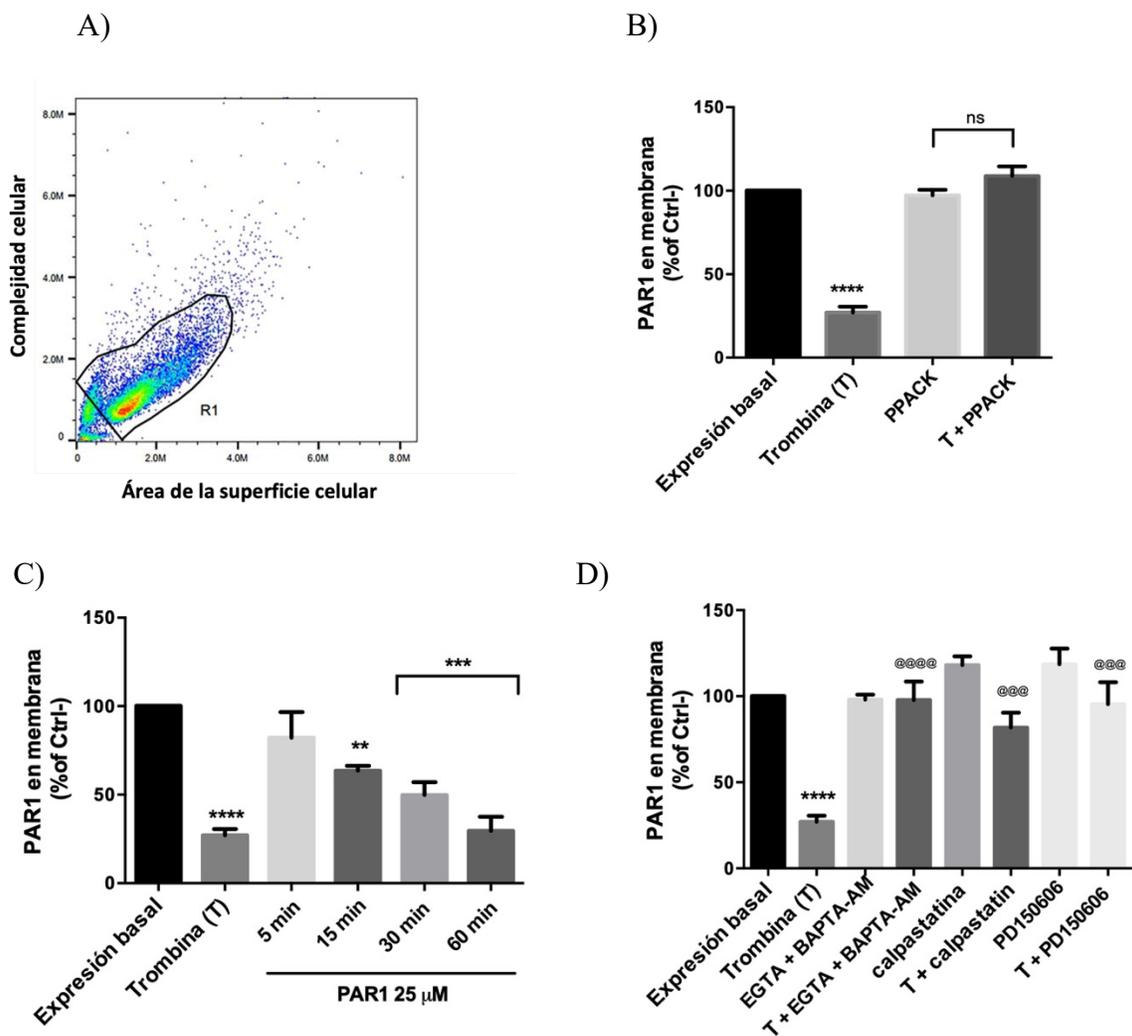


Fig. 18. La calpaína se relaciona con la expresión de PAR1 en la membrana. La expresión de PAR1 se midió usando citometría de flujo, los datos se expresan como porcentaje. **A)** la población para el análisis se eligió de manera automática. **B-C)** La trombina 10 nM y el agonista de PAR1 2.5 μM disminuye la expresión de PAR1 en la membrana. **D)** Se estimuló en presencia de PPACK 25 μM, calpastatina 1 μM y PD150606 100 μM. Los valores graficados son el promedio de 3 experimentos independientes ± EE. Los resultados se analizaron con una prueba de ANOVA de comparación múltiple y una posterior prueba de Turkey's con un $\alpha = 0.001$ (****), $\alpha = 0.01$ (***) o no significativo (ns). Se comparó contra el grupo tratado con trombina (10 nM) con un $\alpha = 0.001$ (@@@@).

6.6. La trombina promueve la degradación de la RCP

Sabíamos que la trombina promovía la activación de la calpaína y la degradación de la α -espectrina, sabíamos que ambos fenómenos dependían del incremento de Ca^{2+} intracelular. Sin embargo, decidimos profundizar más en el mecanismo que regula la internalización de PAR1. Se sabe que la proteína Rab11a regula la internalización y posterior degradación de PAR1. Rab11a se une a una proteína efectora llamada RCP, la cuál tiene tres dominios PEST sustrato de la calpaína. Por lo tanto, para continuar con el esclarecimiento de los mecanismos que regulan la internalización de PAR1 decidimos estudiar si la activación de la calpaína se relaciona con la degradación de la RCP ⁷³. Averiguamos si la trombina promueve la degradación de la RCP en células del EPR derivadas de humano. Hicimos una curva de tiempo en la que estimulamos las células con 2 U/ml de trombina, (lo cual es equivalente a 10nM de trombina usado en los experimentos anteriores); y evaluamos la expresión de la proteína RCP en células ARPE-19. Como se observa en la Fig.19A, la trombina promueve la degradación de la RCP de manera dependiente del tiempo. Las células se estimularon con 2 U/ml de trombina desde 1 Hr y hasta 24 H. Como control positivo se usó 10 % de SFB, la cantidad de RCP se redujo al ~30% comparado con las células no estimuladas. A partir de las 8 h se observó una disminución de la cantidad de RCP presente en las células ~45%. El mayor efecto se observó en células estimuladas con 2 U/ml de trombina durante 12 y 24h en ambos casos se redujo la cantidad de proteína hasta ~10%. Para averiguar si la degradación de la RCP ocurría como una consecuencia del incremento de Ca^{2+} y una posterior activación de la calpaína, estimulamos células con 2 U/ml de trombina en presencia de un quelante del Ca^{2+} intracelular y un inhibidor de la calpaína. Demostramos que el efecto de la degradación de la RCP se debe al incremento de Ca^{2+} intracelular y la posterior activación de la calpaína,

dado que la estimulación con 2 U/ml de trombina durante 24h en presencia de un quelante de Ca^{2+} intracelular (BAPTA-AM) y un inhibidor de la calpaína (Calpain III) no promueve el efecto de degradación de la RCP, la degradación de la RCP se revierte y se conserva ~90% de la proteína (Fig.19B). Una vez que demostramos que la trombina promueve la degradación de la RCP, mediante un mecanismo dependiente del incremento de Ca^{2+} y la posterior activación de la calpaína, nos preguntamos si era posible determinar a través de cuál de los PARs ocurría. Para ello, estimulamos a las células con agonistas de los diferentes PARs (PAR 1 – 4). Observamos que la degradación de la RCP ocurre principalmente a través del receptor PAR1, el agonista de PAR1 promueve un efecto similar a lo observado con la trombina (Fig. 19C), la estimulación con el agonista de PAR1 degrada ~50% de la RCP. Esto co-relaciona con los datos previos en el que observamos que la activación de la calpaína ocurría principalmente a través de PAR1. Estos datos en conjunto nos permiten inferir que la estimulación con trombina promueve la degradación de la RCP a través de un mecanismo dependiente del incremento de Ca^{2+} y la posterior activación de la calpaína. Del mismo modo podemos inferir que la degradación de la RCP ocurre principalmente a través de PAR1.

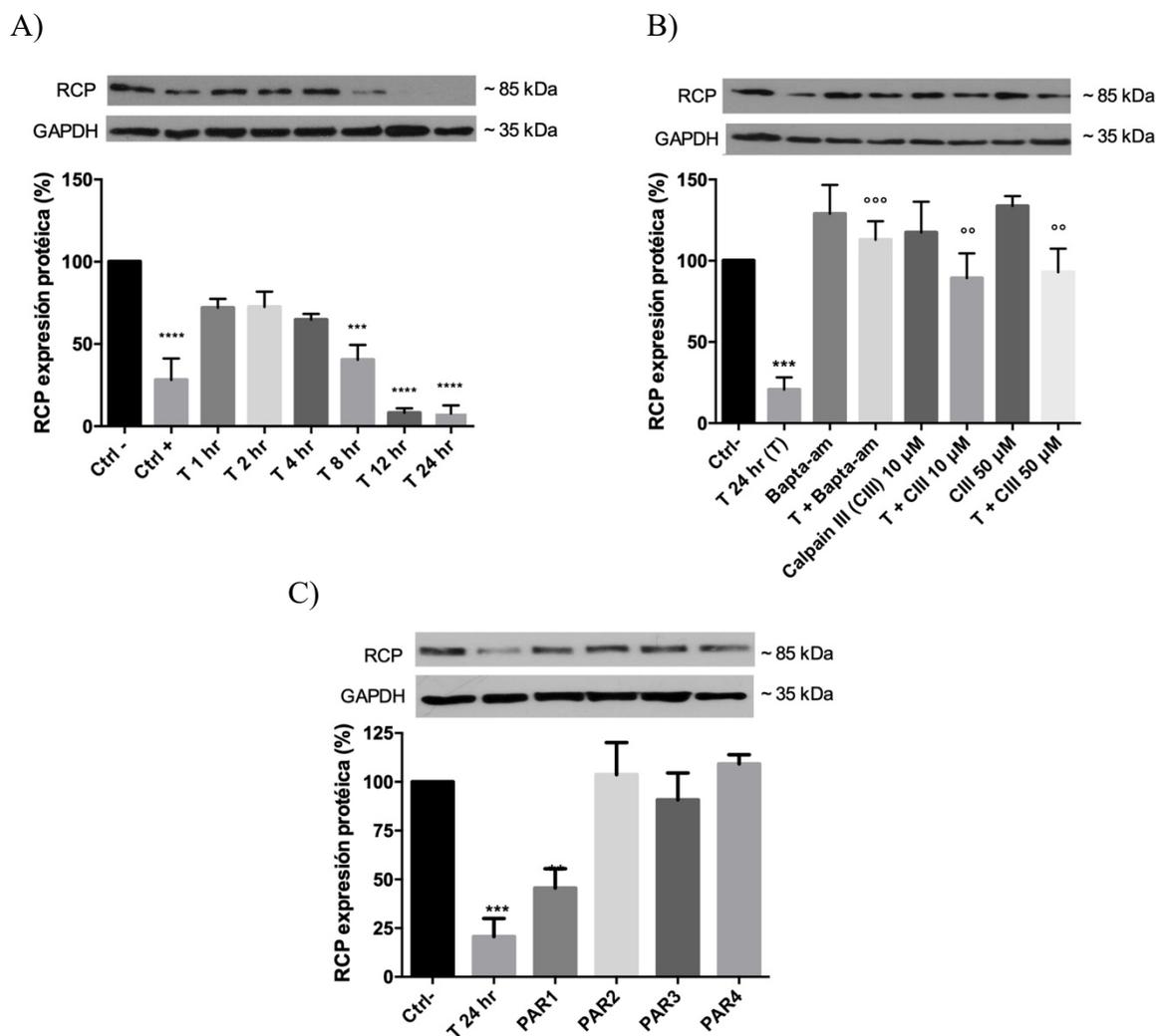


Fig. 19. La trombina promueve la degradación de la RCP. Las células sin estimular son el control negativo. Células estimuladas con 10 % de son el control positivo. La cantidad de RCP se expresa como porcentaje comparado contra el control negativo. **A)** Se estimuló con trombina 2 U/ml. **B-C)** Se estimuló en presencia de calpaina III 10 μM y 50 μM o PD150606 100 μM **(C)**. Se estimuló con los péptidos agonistas de los PARs PAR1 2.5 μM, PAR2 25 μM, PAR3 25 μM y PAR4 25 μM. Los valores son el promedio de 3 experimentos independientes ± EE. Los resultados se analizaron con una prueba de ANOVA de comparación múltiple y una posterior prueba de Turkey's con un $\alpha = 0.001$ (****), $\alpha = 0.01$ (**), $\alpha = 0.05$ (*). Se comparó vs el grupo tratado con 2 U/ml de trombina $\alpha = 0.01$ (°°°), $\alpha = 0.05$ (°°).

6.7. La trombina promueve el desensamble del complejo Rab11a/RCP

Nos preguntamos si podíamos evaluar la interacción entre Rab11a y RCP con la finalidad de evaluar un posible desensamble del complejo Rab11a/RCP promovido por la trombina. Para demostrar que el complejo Rab11a/RCP se formaba en las células ARPE19, nuestro primer experimento fue hacer una inmunoprecipitación. Usamos esferas de sefarosa G a las que acoplamos un anticuerpo anti-Rab11a o anti-RCP. Demostramos que el complejo Rab11a/RCP está presente en las células ARPE-19 y que se desensambla en presencia de 2 U/ml de trombina. Demostramos que el desensamble del complejo Rab11a/RCP depende del tiempo de estimulación, dado que a los 5 min de estimulación con trombina observamos la mínima asociación entre Rab11a/RCP (Fig. 20). Estos datos nos permiten inferir que la trombina promueve el desensamble del complejo Rab11a/RCP en un mecanismo dependiente del tiempo (Fig. 20C).

Ya que la similitud entre Rab11a y Rab11b es del 90%, decidimos analizar la participación de Rab11a/RCP de manera más precisa. Analizamos la interacción de Rab11a/RCP mediante FRET. Para ello, transfectamos los plásmidos CFP-Rab11a y RCP-YFP en células ARPE19. La proteína CFP-Rab11a se excita a los 433 nm y emite a los 475 nm (donador). La proteína RCP-YFP se excita a los 513 nm y emite a los 527 nm (aceptor) (Fig. 21). Se demostró que las proteínas RCP-YFP y Rab11-CFP son capaces de formar un heterodímero⁸¹. En los experimentos de FRET observamos algo similar a lo observado en los experimentos de inmunoprecipitación. La interacción entre CFP-Rab11a/RCP-YFP disminuye en presencia de 10% de SFB hasta en ~50%, control positivo. De manera importante se observa que el desensamble de CFP-Rab11a/RCP-YFP ocurre también en células estimuladas con 2 U/ml de trombina a partir de 1 min en este caso observamos que ~60% del complejo permanece

unido. El mayor efecto en el desensamble de Rab11a/RCP se observó en células estimuladas con trombina durante 5 minutos, en este caso solo ~40% del complejo permanece unido. En el caso de los experimentos de FRET también observamos una dependencia del tiempo de estimulación con trombina en el desensamble del complejo CFP-Rab11a/RCP-YFP. El desensamble del complejo CFP-Rab11a/RCP-YFP se observa a partir de un minuto de estimulación. Sin embargo, a los 5 minutos se observa menor interacción entre las proteínas CFP-Rab11a y RCP-YFP. Se calculó el índice de FRET usando el plugin FRET and colocalization analyzer para Fiji (Fig. 22A-B). Al comparar los datos de las figuras 19, 20 y 22, notamos que la degradación de RCP no se relaciona de manera directa con la separación del complejo RCP, es decir, el desensamble del complejo Rab11a/RCP ocurre de manera independiente a la cantidad de RCP disponible en la célula.

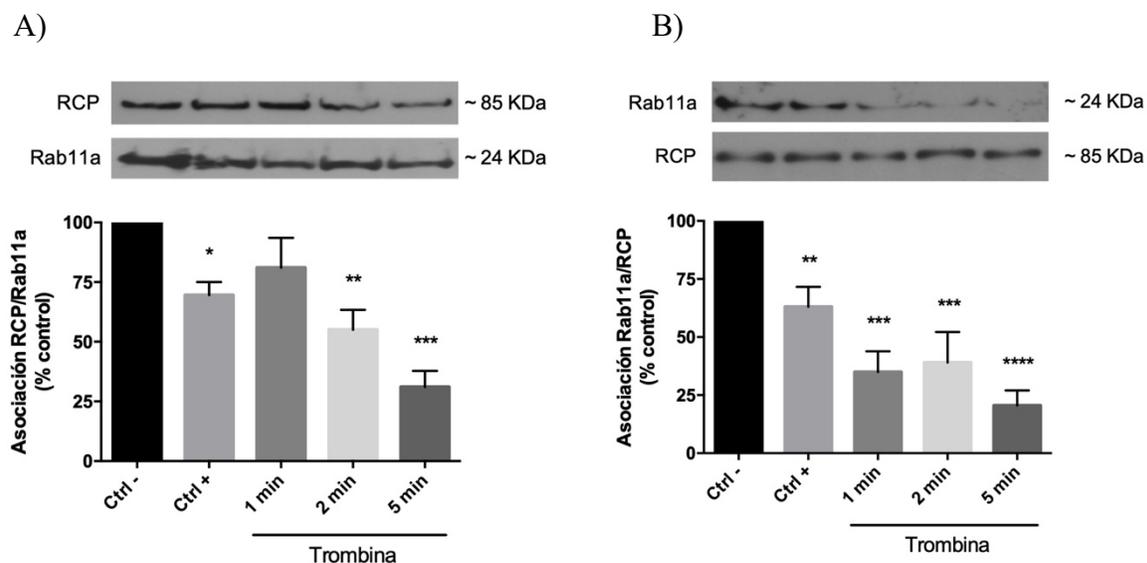


Fig. 20. La trombina promueve el desensamble del complejo Rab11/RCP. Las células sin estimular se usaron como control negativo. Se usaron células estimuladas con 10 % de SFB como control positivo. La cantidad de RCP se expresa como porcentaje comparado contra las células del control negativo. **A)** Experimentos con anti-Rab11a. **B)** Experimentos con anti-RCP. Los valores son el

promedio de 3 experimentos independientes \pm EE. Los resultados se analizaron con una prueba de ANOVA de comparación múltiple y una posterior prueba de Turkey's.

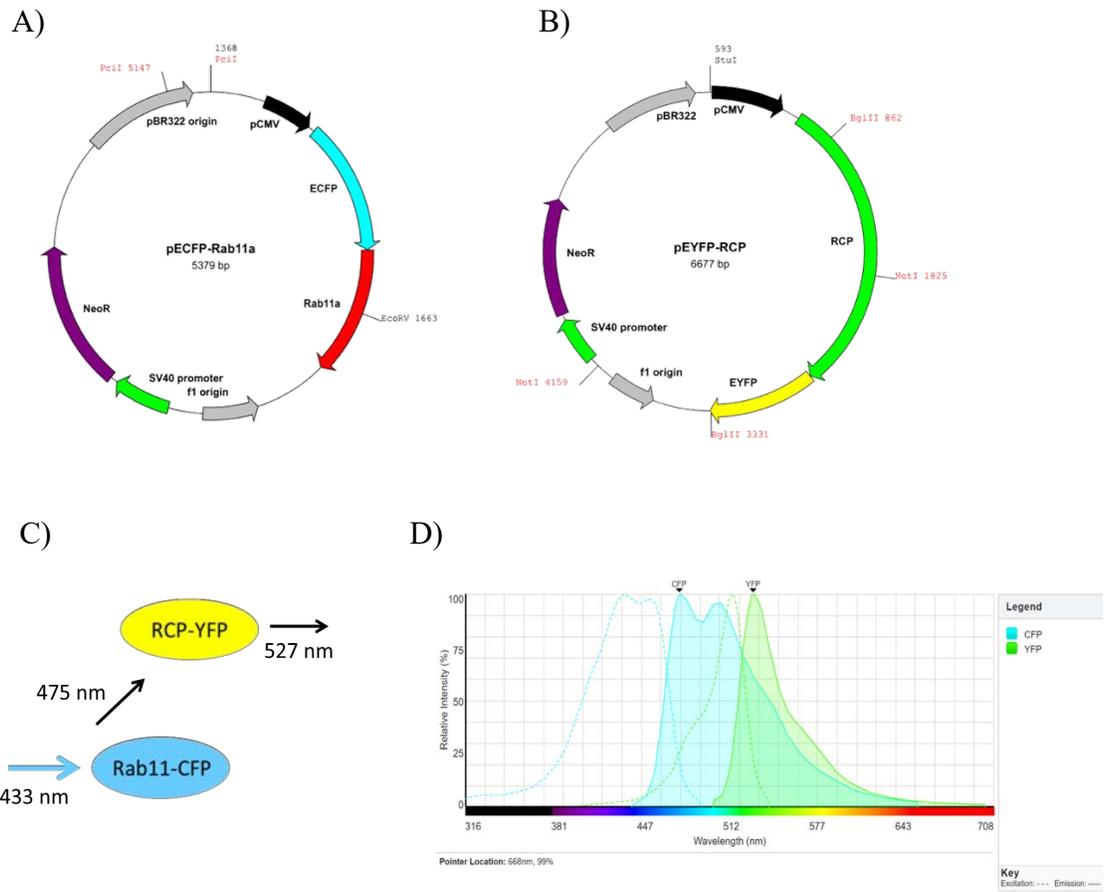


Fig. 21. Plásmidos recombinantes para la sobreexpresión de RCP-YFP y Rab11-CFP. A) La secuencia de RCP y Rab11 corresponden a las secuencias WT completas. RCP se ancla a YFP (Ex: 513 – Em: 527) (aceptor) y Rab11a se ancla a CFP (Ex: 433 nm – Em: 475) (donador). **B)** Modelo de estimulación de FRET. **C)** Emisión y excitación de CFP y YFP.

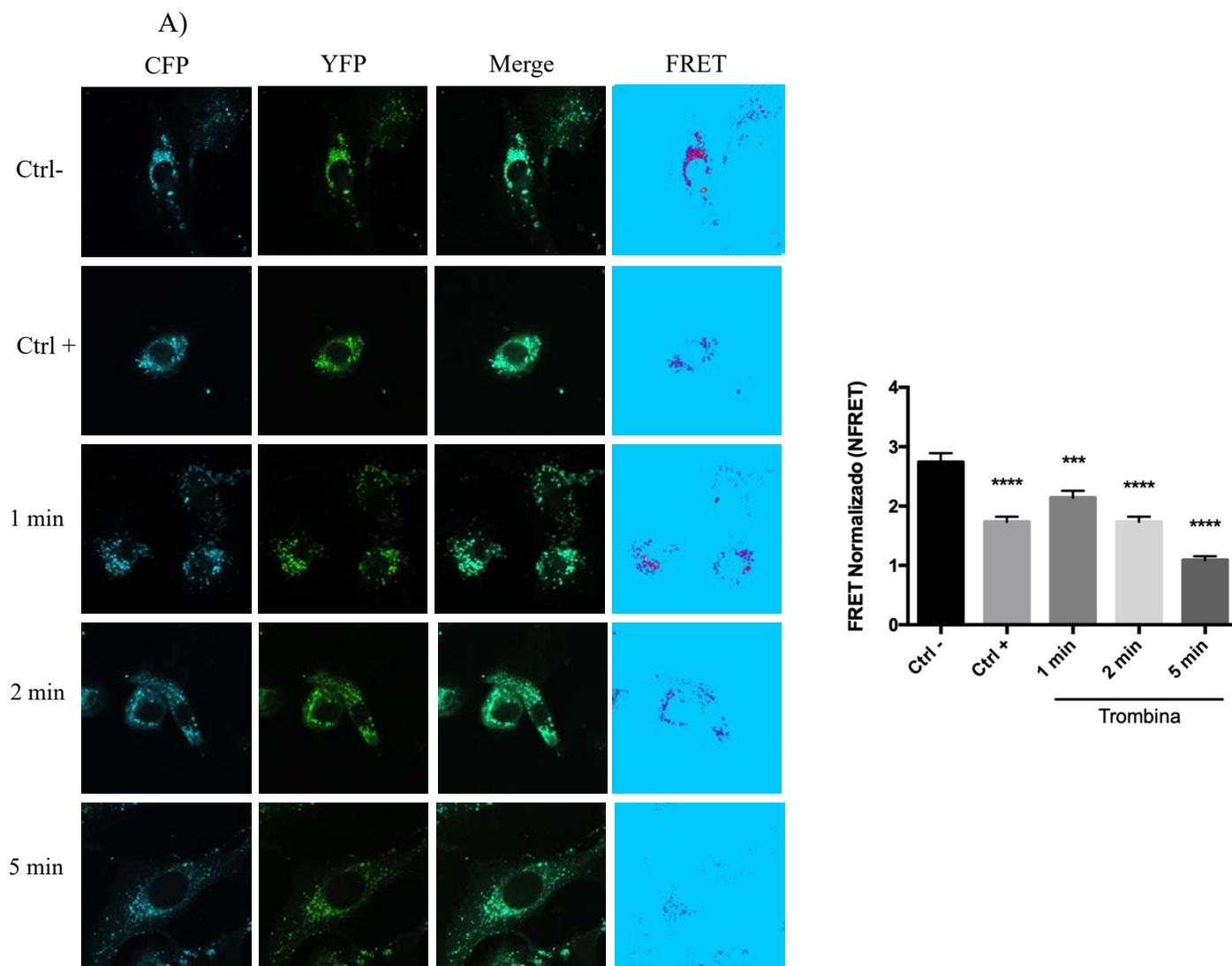


Fig.22. La trombina promueve el desensamble del complejo CFP-Rab11/RCP-YFP FRET. Las células sin estimular se usaron como control negativo. Se usaron células estimuladas con 10 % de SFB como control positivo. Los valores se expresan como FRET normalizado. A) Imágenes de microscopía confocal, las imágenes se adquirieron con un objetivo 63x en un microscopio LSM800. B) Se calculó el FRET Normalizado. Se analizaron 10 campos de cada experimento. Los valores son el promedio de 3 experimentos independientes \pm EE. Los resultados se analizaron con una prueba de ANOVA de comparación múltiple y una posterior prueba de Turkey's con un $\alpha = 0.001$ (****).

6.8. La calpaína regula el desensamble del complejo Rab11a/RCP

Sabíamos que la trombina promueve la activación de la calpaína en un mecanismo dependiente del incremento de Ca^{2+} intracelular. En la figura 19 observamos que la calpaína a su vez promueve la degradación de la proteína RCP. RCP es sustrato de la calpaína debido a los tres dominios PEST presentes en la secuencia de RCP. Por lo tanto, nos preguntamos si la calpaína se relacionaba con el desensamble del complejo Rab11a/RCP. Para ello, hicimos experimentos de inmunoprecipitación en células estimuladas con 2 U/ml de trombina en presencia de un inhibidor de la actividad catalítica de la calpaína (Fig. 23 A-B). Observamos que la inhibición de la calpaína impide el desensamble del complejo Rab11a/RCP promovido por la trombina. Tanto en experimentos en los que acoplamos el anticuerpo anti-Rab11a (Fig. 23A) como en los que acoplamos el anticuerpo anti-RCP (Fig. 23B), observamos que el desensamble del complejo Rab11a/RCP depende completamente de la activación de la calpaína, dado que en presencia del inhibidor de la calpaína el complejo permanece unido. Del mismo modo, en experimentos de FRET observamos que la interacción entre CFP-Rab11a/RCP-YFP no se afecta por la estimulación con 2 U/ml de trombina durante 5min en presencia del inhibidor de la calpaína. Estos datos nos permiten suponer que la activación de la calpaína dada por la trombina regula el desensamble del complejo Rab11a/RCP (Fig. 24).

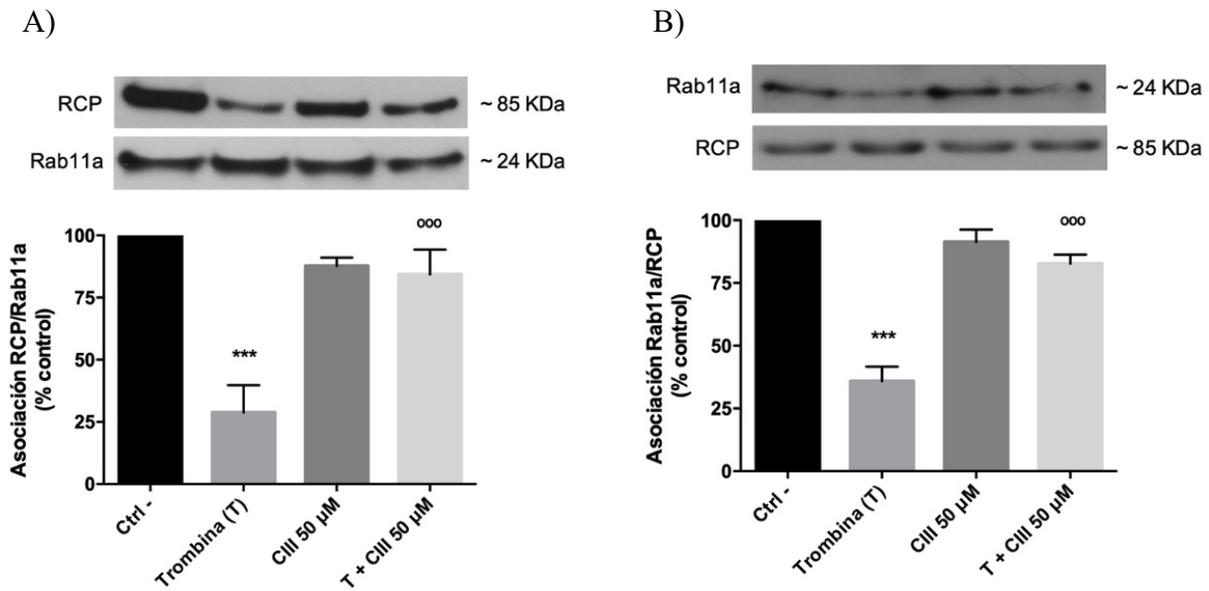


Fig. 23. La calpaína regula el desensamble del complejo Rab11/RCP. Las células sin estimular se usaron como control negativo. La cantidad de RCP o Rab11a se expresa como porcentaje comparado contra las células del control negativo. **A)** la inmunoprecipitación se hizo con anti-Rab11a. **B)** La inmunoprecipitación se hizo con anti-RCP. **(A-B)** Se estimuló con trombina en presencia de 50 μM de Calpain III. Los valores son el promedio de 3 experimentos independientes ± EE. Los resultados se analizaron con una prueba de ANOVA de comparación múltiple y una posterior prueba de Turkey's con un $\alpha = 0.01$ (***) . Se comparó vs el grupo tratado con 2 U/ml de trombina $\alpha = 0.01$ (ooo).

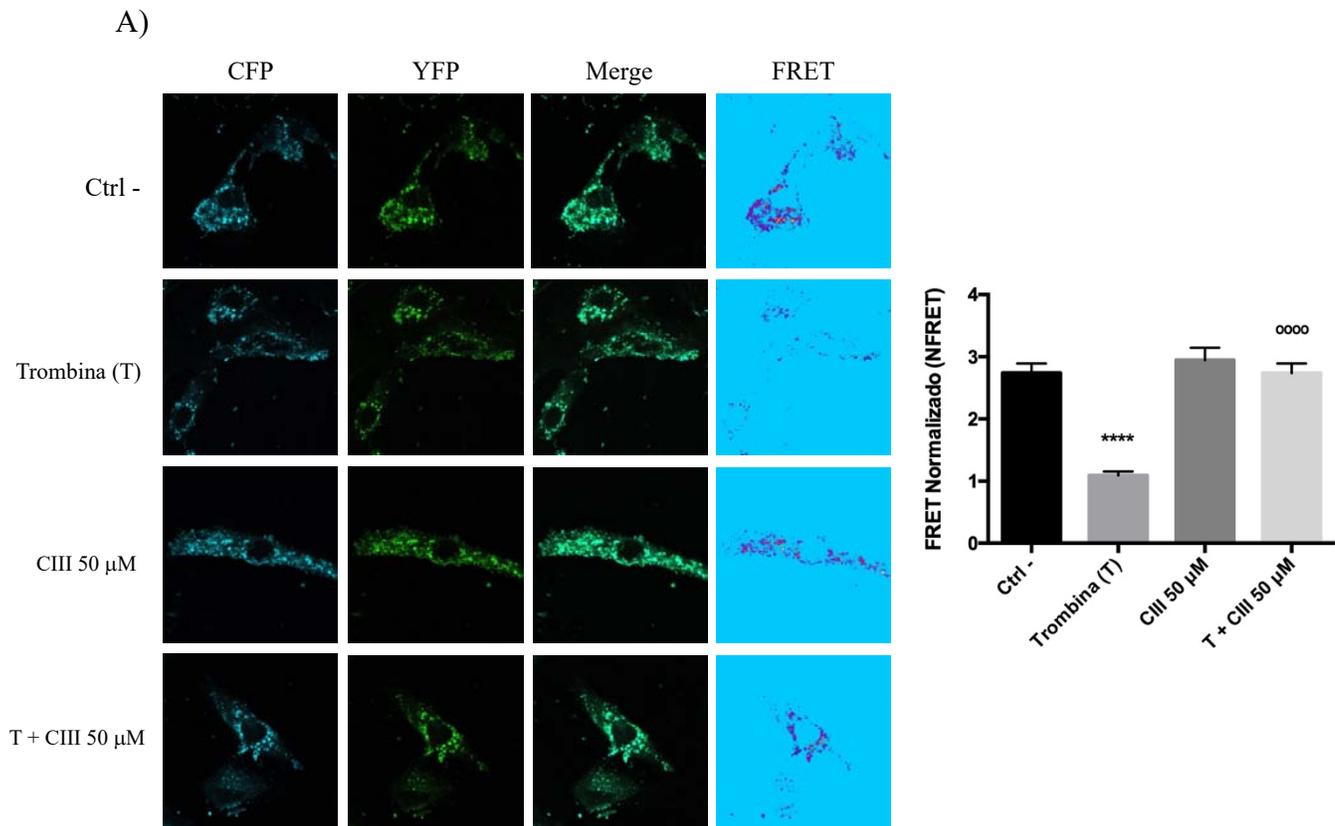
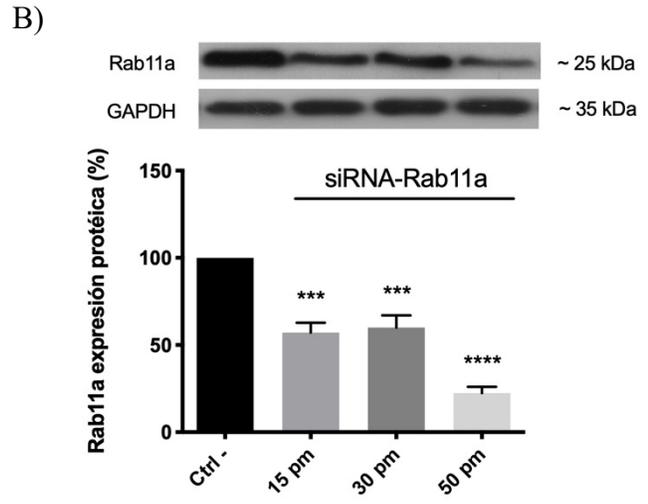
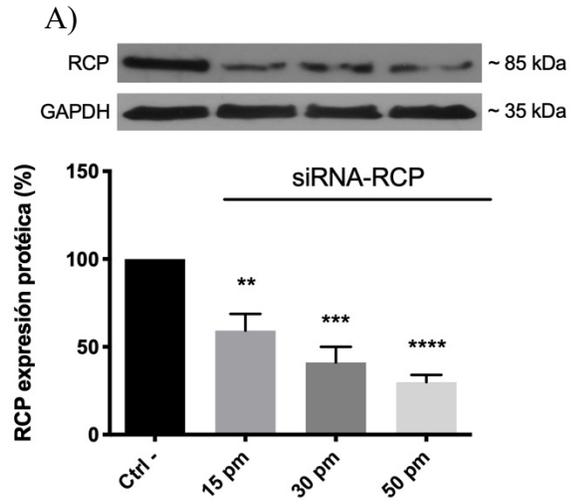


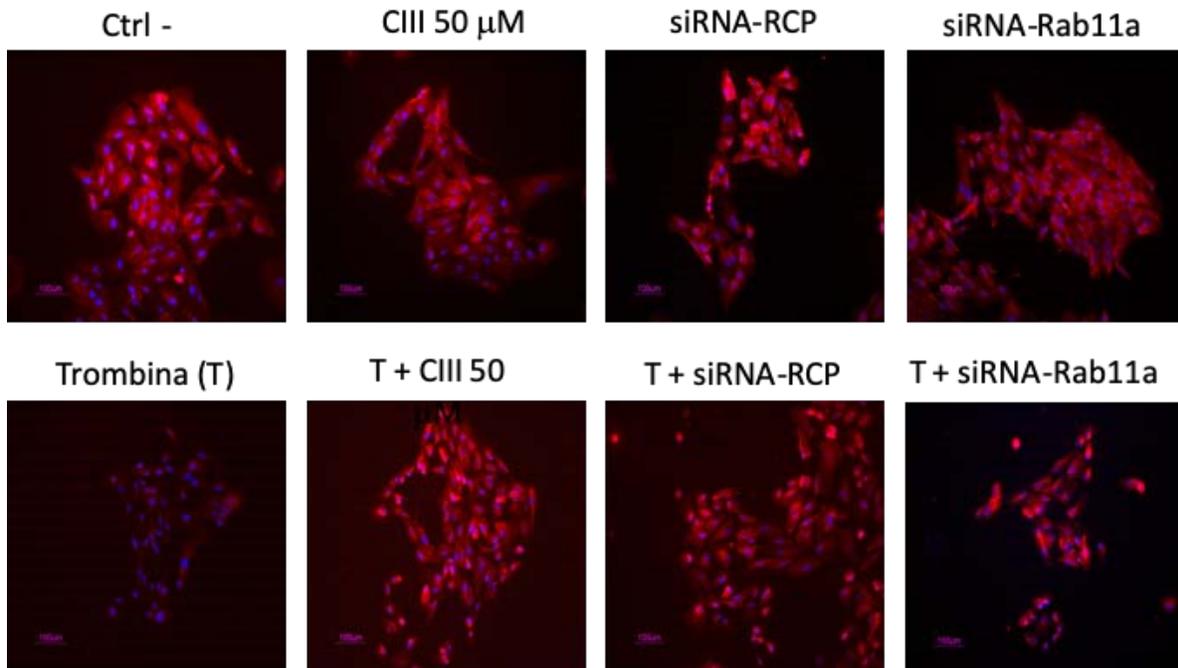
Fig. 24. La calpaína regula el desensamblaje del complejo CFP-Rab11/RCP-YFP FRET. Las células sin estimular se usaron como control negativo. Los valores se expresan como FRET normalizado. Se estimuló con trombina en presencia de 50 μ M de Calpain III. **A)** Imágenes de microscopía confocal, las imágenes se adquirieron con un objetivo 63x en un microscopio LSM800 (Zeiss, Jena, Alemania). **B)** Se calculó el FRET normalizado. Se analizaron 10 campos de cada experimento. Los valores son el promedio de 3 experimentos independientes \pm EE. Los resultados se analizaron con una prueba de ANOVA de comparación múltiple y una posterior prueba de Turkey's con $\alpha = 0.001$ (****). Se comparó vs el grupo tratado con 2 U/ml de trombina $\alpha = 0.01$ (°°°°).

6.9. El complejo Rab11a/RCP regula la internalización de PAR1

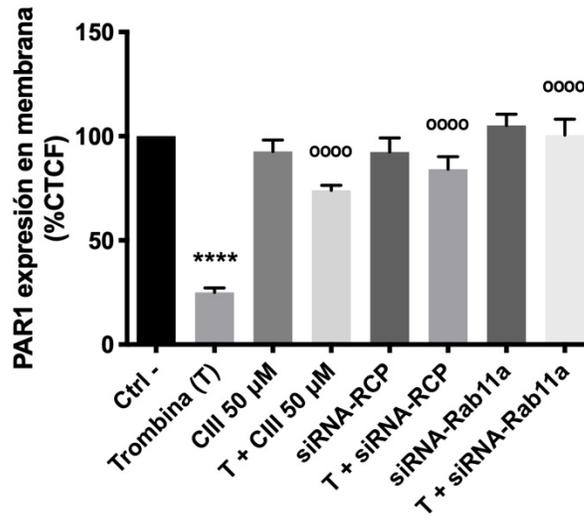
Ya que previamente mostramos que la calpaína se relaciona con la internalización de PAR1, nos preguntamos si el desensamble del complejo Rab11a/RCP se relacionaban con la internalización de PAR1. Se sabe que el complejo Rab11a/RCP se relaciona con la internalización y expresión en membrana de diferentes proteínas. Sabemos que en células estimuladas con trombina la calpaína regula el desensamble del complejo Rab11a/RCP (Fig. 23 y 24), por esta razón nuestra hipótesis sugiere que la calpaína regula el desensamble del complejo Rab11a/RCP y este desensamble es la señal que se relaciona con la internalización del receptor PAR1 activado por trombina. Para demostrar que el complejo Rab11a/RCP se relaciona con la internalización de PAR1 evaluamos la expresión de PAR1 en la membrana. La expresión de PAR1 en células estimuladas con trombina disminuyó hasta permanecer solo un 25% comparado con las células sin estimular. Dicho efecto se abate en presencia de un inhibidor de la actividad catalítica de la calpaína (Fig. 25C-D). Por otro lado, para evaluar la participación del complejo Rab11a/RCP, transfectamos células de EPR durante 24 h con 50 pm de un siRNA dirigido contra RCP (siRNA-RCP) o 50 pm de un siRNA dirigido contra Rab11a (siRNA-Rab11a). Logramos inhibir la expresión de RCP hasta en ~70% comparado contra células no transfectadas con el siRNA dirigido contra RCP (Fig. 25A). Estimulamos con trombina las células transfectadas con el siRNA-RCP y con el siRNA-Rab11a. Como se esperaba, no se observó la internalización de PAR1 en células estimuladas con 2 U/ml de trombina durante 5 min en presencia del siRNA-RCP o el siRNA-Rab11a. Estos datos nos permiten inferir que el complejo Rab11a/RCP se relaciona de manera directa con la internalización de PAR1 activado por trombina, en células del EPR.



C)



D)



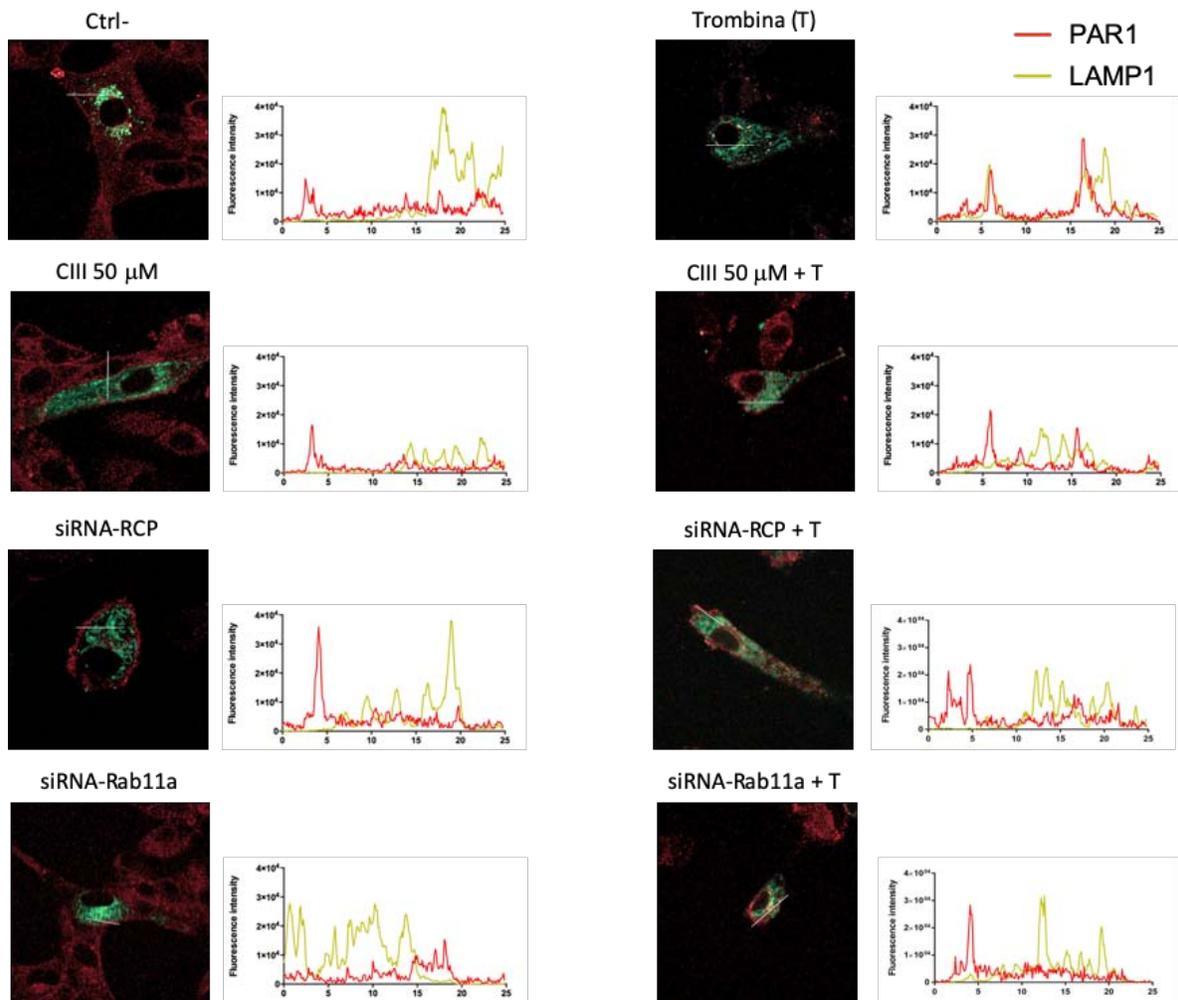
*Fig. 25. El complejo Rab11a/RCP regula la internalización de PAR1. Los resultados se compararon contra el control negativo (células sin estimular). La expresión de PAR1 se midió usando microscopía de epifluorescencia, A-B) Las células se transfectaron con 50 pm de siRNA-RCP o 50 pm de siRNA-Rab11a. C-D) Se estimuló en presencia de 50 μM de calpain III o siRNA-RCP y siRNA-Rab11a. Los valores graficados son el promedio de 3 experimentos independientes ± EE. Se analizaron 100-200 células por campo, de un total de 4 campos para cada condición experimental. Los resultados se analizaron con una prueba de ANOVA de comparación múltiple y una posterior prueba de Turkey's con un $\alpha = 0.001$ (****), $\alpha = 0.01$ (***), $\alpha = 0.05$ (**). Se comparó contra el grupo tratado con 2 U/ml de trombina con un $\alpha = 0.001$ (oooo).*

6.10 El complejo Rab11a/RCP se relaciona con la degradación de PAR1

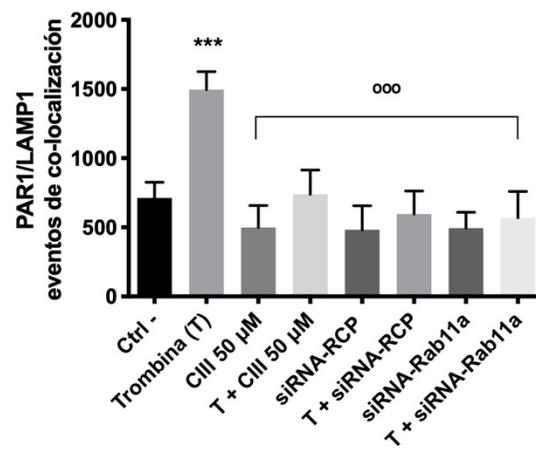
Analizamos la participación del complejo Rab11a/RCP en la degradación de PAR. Hicimos experimentos de co-localización en los que marcamos los lisosomas usando la sobreexpresión de la proteína asociada a lisosoma LAMP1-mGFP. Del mismo modo marcamos al receptor PAR1 con un anticuerpo específico, usamos un anticuerpo secundario

Alexa 647. Medimos la co-localización de PAR1 (rojo) con LAMP1-GFP (verde). Como esperábamos, en los análisis de line-scan observamos que la estimulación con 2 U/ml de trombina promueve un incremento en la co-localización de PAR1-LAMP1 lo cual se traduce como un incremento en la degradación del receptor. Este efecto se inhibe completamente en presencia de un inhibidor de la calpaína. El efecto de degradación del receptor se inhibe también en presencia del siRNA-RCP y del siRNA-Rab11a (Fig. 26 A). Dichos resultados nos permiten suponer que la degradación de PAR1 se relaciona con la activación de la calpaína y del mismo modo se relaciona con la presencia de RCP y Rab11a. En un análisis posterior se tomaron en cuenta todos los eventos de co-localización entre PAR1-LAMP1, observamos que la estimulación con 2 U/ml de trombina incrementa el número total de eventos de colocalización sobre toda la superficie celular. Dicho incremento se inhibe en presencia del inhibidor de la calpaína y de los siRNA-RCP y siRNA-Rab11a (Fig. 26B).

A)



B)



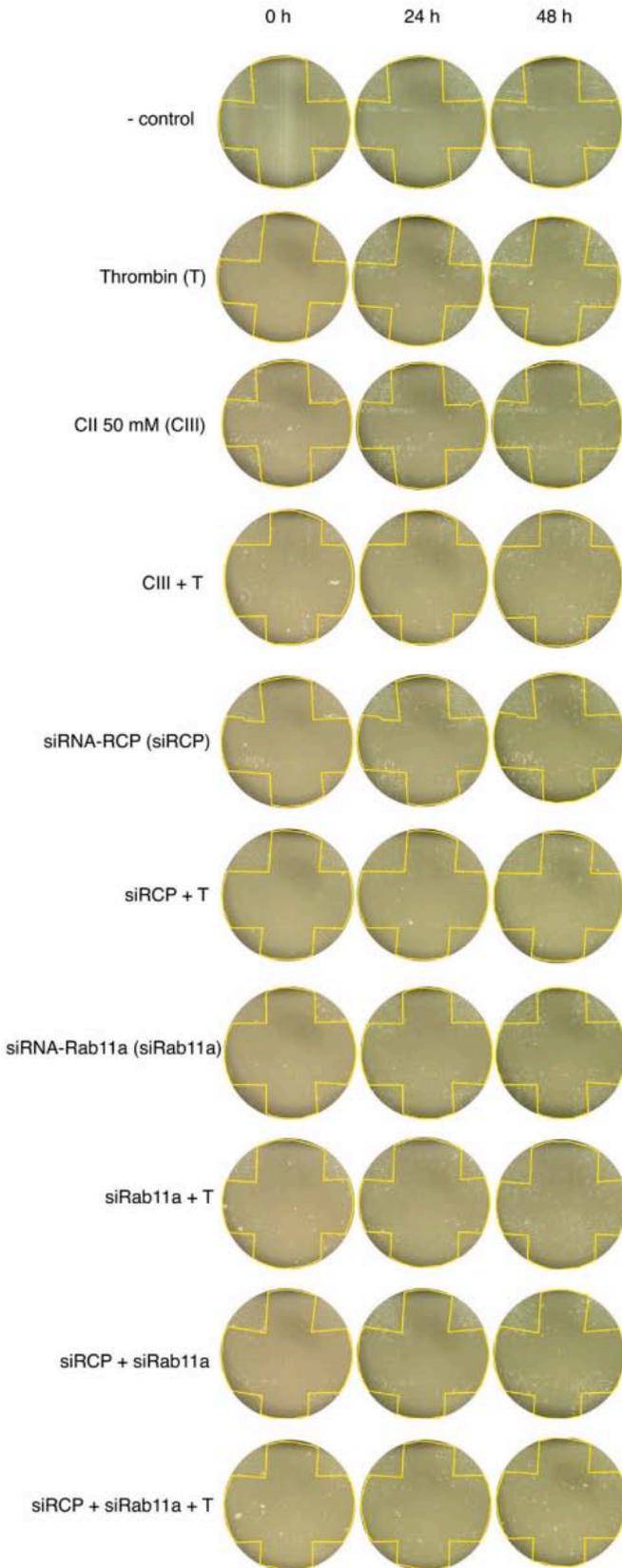
*Fig. 26. El complejo Rab11a/RCP regula la degradación de PARI. Los resultados se compararon contra el control negativo (células sin estimular). La co-localización de PARI-LAMP1-mGFP se midió usando microscopía confocal. A) Análisis de line-scan. Se estimuló con 2 U/ml de trombina en presencia de CIII 50 μ M, 50 pm de siRNA-RCP y 50 pm de siRNA-Rab11a B) Se analizó el número total de eventos de co-localización el área celular total de cada imagen. Se analizó una célula por campo, de un total de 15 campos para cada condición experimental Los valores graficados son el promedio de 3 experimentos independientes \pm EE. Los resultados se analizaron con una prueba de ANOVA de comparación múltiple y una posterior prueba de Turkey's con un $\alpha = 0.01$ (***) . Se comparó contra el grupo tratado con 2 U/ml de trombina con un $\alpha = 0.01$ (°°°).*

6.11 La inhibición de la calpaína y el complejo Rab11a/RCP atenúa la proliferación y migración de las células del EPR.

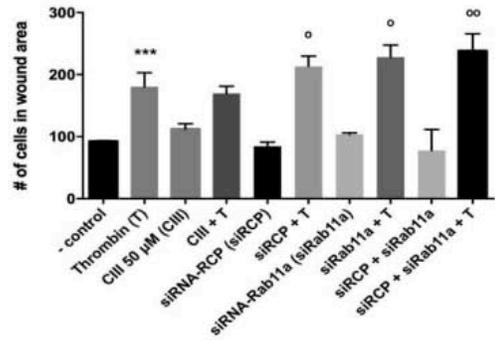
Finalmente, analizamos la migración y la proliferación de células del EPR estimuladas con trombina. Demostramos que tanto la calpaína como el complejo Rab11a/RCP regulan la proliferación y migración de las células del EPR. En primer lugar, demostramos que la trombina promueve un incremento de la migración y la proliferación en células del EPR. Demostramos que la inhibición de la calpaína con 50mM de calpastatina produjo una reducción en la movilidad de las células del EPR en ensayos de wound healing, lo cual se traduce como una reducción en la migración (Fig. 27 A-C). Los datos se analizaron a las 24h y 48h después de hacer la herida. De manera similar la inhibición de la calpaína redujo la tasa de proliferación en células del EPR (Fig. 27D). Demostrando que la calpaína regula la migración y la proliferación de células del EPR dada por trombina.

Siguiendo con el modelo propuesto hasta este punto, decidimos analizar la participación del complejo Rab11a/RCP sobre la migración y la proliferación de células del EPR estimuladas con trombina. Transfectamos células del EPR con RNAi dirigido contra Rab1a y RCP de manera individual y combinada. Observamos que las células del EPR reducen la migración y la proliferación de células del EPR estimuladas con trombina en presencia de los RNAi dirigidos contra Rab11a y RCP (Fig. 27). Lo cual demuestra que tanto Rab11a como RCP son moléculas necesarias para que ocurra la migración y la proliferación de células del EPR. Probablemente debido a que la migración y la proliferación de células del EPR requiere de la internalización de PAR1. Al reducir los niveles de internalización de PAR1, la migración y la proliferación de células del EPR tiene un efecto similar, mitigando los efectos de la trombina.

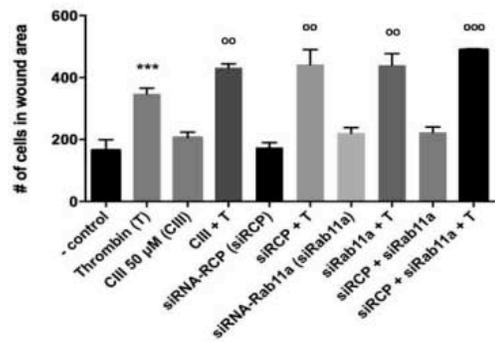
A)



B)



C)



D)

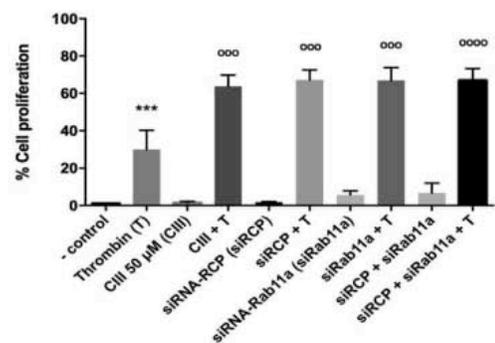


Fig. 27. La inhibición de la calpaína y el complejo Rab11a/RCP produce una reducción en la migración y la proliferación de las células del EPR. Los resultados se compararon contra el control positivo (células estimuladas con trombina). La migración de las células del EPR se midió haciendo ensayos de wound healing. La proliferación se midió mediante experimentos de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). La migración se expresa como el número de células presentes en la herida después de 24h y 48h. La proliferación se expresa como porcentaje del control negativo (células privadas de suero durante 24 h, sin estimular). **A)** Ensayos de wound healing, se tomaron imágenes de los mismos campos a las 24h y 48h. Se analizó el número total de células presentes en la herida a las 24h **(B)** y a las 48h **(C)**. **D)** Se midió mediante ensayos de MTT la proliferación celular. Los valores graficados son el promedio de 3 experimentos independientes \pm EE. Los resultados se analizaron con una prueba de ANOVA de comparación múltiple y una posterior prueba de Turkey's.

7. Discusión

El contacto de las células del EPR con ciertos componentes del plasma sanguíneo como la trombina, desencadena fenómenos de migración y proliferación característicos de la VRP. El esclarecimiento de los mecanismos moleculares a través de los cuales ocurren estos fenómenos es fundamental para el entendimiento de la VRP. Previamente se demostró que la trombina promueve la migración y la proliferación de las células del EPR y que dichos fenómenos ocurren debido a la activación del receptor PAR1 por la trombina ^{24,25,85}. Del mismo modo de manera reciente se describió que la proliferación y la migración de las células del EPR dependen del incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular ⁴¹.

El PAR1 es un receptor perteneciente a la familia de los GPCRs. La activación de PAR1 por trombina es uno de los fenómenos que desencadenan la migración y proliferación de células del EPR y uno de los principales agentes causales de la VRP. Los mecanismos que regulan a PAR1 son un importante motivo de estudio, ya que el entendimiento de dichos mecanismos permitiría comprender de mejor manera los mecanismos que regulan la VRP.

En este trabajo demostramos que el incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular, promovido por la estimulación trombina, ocurre principalmente a través del receptor PAR1. Dicho incremento tiene un origen tanto intracelular como extracelular. Demostramos que las células estimuladas con trombina y con el péptido agonista de PAR1 incrementan la concentración de Ca^{2+} y que aproximadamente 80% de este Ca^{2+} proviene principalmente de las pozas endógenas. Sin embargo, observamos que aproximadamente 20% es Ca^{2+} proveniente del exterior celular. Trabajos recientes demostraron que las células del EPR

estimuladas con EGF, presentan un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular, dicho incremento tiene origen intracelular y extracelular, tal como lo observamos en este trabajo. La entrada de Ca^{2+} extracelular en células del EPR ocurre a través de canales operados por el vaciamiento del retículo (SOCE) ^{41,86}. Por otro lado, también se sabe que las células del EPR regulan la entrada de Ca^{2+} extracelular a través de canales dependientes de voltaje, canales Icrac y canales TRPC en la membrana ^{83,87,88}. De manera importante, observamos que las células estimuladas con el agonista de PAR3 presentaban un incremento de Ca^{2+} menor, comparado con las células estimuladas con el agonista de PAR1. Los datos indican que PAR3 señala de manera independiente. Nuestros datos coinciden con los datos de otros grupos de trabajo quienes demostraron que la trombina activa a PAR3 y este señala de manera independiente acoplándose a la vía de Gq y promoviendo la liberación de Ca^{2+} , tal como se muestra en este trabajo ^{89,90}.

Previamente Tsai, et al. (2014) ⁹¹, demostraron que en plaquetas humanas la trombina activa a la calpaína y que dicha activación depende del incremento de la concentración del Ca^{2+} intracelular ⁹¹. En este trabajo demostramos que, en las células del EPR la estimulación con trombina promueve la activación de la calpaína y que esta activación depende del aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} . PAR1 es el receptor a través del cual se genera una mayor entrada de Ca^{2+} , comparado con PAR3 y PAR4 ⁴⁰. Los datos sugieren que el incremento de Ca^{2+} generado por PAR1 es suficiente para activar a la μ -calpaína, esta isoforma se activa con concentraciones milimolares de Ca^{2+} ⁵³. Se sabe que las células del EPR incrementan el Ca^{2+} intracelular a niveles de 2.5 μM en presencia de trombina ⁴⁰, lo cual sería suficiente para activar a la μ -calpaína.

La degradación de la α -espectrina se relaciona con la internalización y posterior degradación en lisosomas de la LDL en vesículas recubiertas de clatrina ⁵⁸. En este trabajo demostramos que la μ -calpaína degrada a la α -espectrina en un mecanismo que depende del incremento de Ca^{2+} intracelular ^{92,93}. Observamos que la degradación de la α -espectrina es menor en las células estimuladas con trombina en presencia de BAPTA-AM (un quelante del Ca^{2+} intracelular) e inhibidores de la calpaína (calpastatina y PD150606). Se sabe que la activación de la calpaína a través del aumento de Ca^{2+} intracelular y la posterior degradación de la α -espectrina son fenómenos necesarios para la internalización de vesículas recubiertas de clatrina ^{61,62}. Demostramos que la presencia de PAR1 en la membrana disminuye en células estimuladas con trombina, esta observación se traduce como la internalización del receptor, dicha internalización disminuye en presencia de inhibidores de la calpaína y en presencia de quelantes de Ca^{2+} intracelular y extracelular (BAPTA-AM y EGTA). Suponemos que la calpaína regula la internalización de PAR1 en vesículas recubiertas de clatrina, mediante un mecanismo que depende del incremento de Ca^{2+} y la posterior activación de la μ -calpaína.

En este trabajo cuestionamos si el desensamble del complejo Rab11a/RCP se relacionaba con la internalización de PAR1. Es sabido que la internalización de PAR1 activado requiere de la presencia de la proteína Rab11 (Grimsey et al. 2016). La proteína Rab11 tiene distintas proteínas efectoras. Una de las proteínas efectoras de Rab11 es la proteína RCP. RCP tiene sitios de unión a Rab11. El ensamble y desensamble del complejo Rab11a/RCP se relaciona con la internalización y la expresión en membrana de diferentes proteínas. Por otro lado, RCP

tiene 3 dominios PEST que son sustrato de la calpaína (Marie, Lindsay, and McCaffrey 2005).

Demostramos que la trombina promueve la degradación de RCP mediante un mecanismo que requiere del incremento de Ca^{2+} y la posterior activación de la calpaína. Dicha degradación se observó a las 8 horas del estímulo con trombina. Una vez que demostramos que la trombina promovía la degradación de la RCP nos preguntamos si esta degradación era suficiente para desensamblar el complejo Rab11a/RCP. Debido a que no teníamos información previa de que el complejo Rab11a/RCP estuviera presente en células del EPR. Lo primero que hicimos fue demostrar que dicho complejo existía en células del EPR. Mediante experimentos de inmunoprecipitación demostramos que Rab11a y RCP interaccionan en las células del EPR, además demostramos que dicho complejo se desensambla en presencia de trombina. Algunos estudios sugieren que el ensamble del complejo Rab11a/RCP es necesario para conducir a los receptores de transferrina ⁸¹ (TfR) desde el aparato de Golgi hacia la membrana. Nuestra hipótesis implica que el desensamble del complejo Rab11a/RCP se relaciona con la internalización de un receptor de membrana, en este caso PAR1.

Una vez que demostramos que el complejo Rab11a/RCP se formaba en células del EPR y que la trombina promovía su desensamble y sabiendo que la calpaína regulaba la degradación de RCP, nos preguntamos si la calpaína regulaba el desensamble del complejo Rab11a/RCP. Para evaluar dicho fenómeno, estimulamos células de EPR con trombina en presencia de un inhibidor de la actividad catalítica de la calpaína, evaluamos haciendo experimentos de inmunoprecipitación y FRET. Como esperábamos, observamos que el desensamble del

complejo Rab11a/RCP depende de la calpaína. En células estimuladas con trombina en presencia de un inhibidor de la calpaína no se observa el desensamble promovido por la trombina. La siguiente pregunta fue evaluar si el complejo Rab11a/RCP y su desensamble se relacionaban con la internalización de PAR1.

Evaluamos la internalización de PAR1 en células del EPR mediante inmunocitoquímicas. Usamos un anticuerpo anti-PAR1 cuyo epítipo se une a un segmento extracelular. Hicimos estos experimentos en células no permeabilizadas, con la finalidad de que el anticuerpo solo se uniera al PAR1 presente en la membrana. Como ya habíamos observado en trabajos previos, la estimulación con trombina promueve la internalización de PAR1 y dicho efecto se revierte en presencia de un inhibidor de la calpaína. Lo siguiente fue demostrar si el complejo Rab11a/RCP se relacionaba con la internalización de PAR1. Para ello transfectamos células de EPR con un siRNA dirigido contra RCP y un siRNA dirigido contra Rab11a y estimulamos con trombina en presencia de ambos siRNA. En estas condiciones observamos que la internalización de PAR1 activado es inhibida por la presencia del siRNA-RCP y el siRNA-Rab11a. Como se esperaba, dicho efecto sugiere que la internalización de PAR1 requiere de la presencia de RCP y Rab11a ². Es posible que, aunque Rab11a esté presente en la célula y sea la encargada de conducir a PAR1 al lisosoma requiera de una interacción con RCP para llevar a cabo dicho fenómeno.

Es sabido que la estimulación con trombina conduce al receptor PAR1 a lisosomas para la finalización de su señalización y posterior degradación. Nosotros demostramos que Rab11a y RCP son proteínas necesarias para que PAR1 sea degradado en lisosomas. La inhibición de la síntesis de Rab11a y RCP impide que PAR1 sea transportado a lisosomas. Evaluamos

la co-localización de PAR1 con LAMP1, como esperábamos, en presencia de trombina PAR1 co-localiza con LAMP1, sin embargo, la internalización de PAR1 se impide en presencia de inhibidores de la calpaína y de manera muy importante, la co-localización de PAR1 con lisosomas se impide en presencia de los siRNA-Rab11a y siRNA-RCP.

Finalmente evaluamos las implicaciones fisiológicas de la activación e internalización de PAR1, así como de los elementos que regulan ambos fenómenos. Demostramos que la inhibición de la activación de la calpaína, tiene como resultado una reducción en el proceso de migración y proliferación de las células del EPR estimuladas con trombina. Del mismo modo, el tratamiento de las células del EPR con RNAi dirigido contra Rab11a y RCP tuvo como resultado una disminución de la migración y la proliferación de las células del EPR estimuladas con trombina. Ambos resultados nos permiten suponer que la calpaína, Rab11a y RCP son moléculas fundamentales en la migración y proliferación dada por trombina en células epiteliales. Estos resultados nos permiten incluso suponer en la posibilidad de evaluar el modelo de activación e internalización de PAR1 aquí propuesto, como una posible vía de tratamiento y diagnóstico de la VRP.

En resumen, demostramos que la activación de PAR1 por trombina promueve un incremento de Ca^{2+} intracelular. Dicho incremento promueve la activación de la proteasa dependiente de Ca^{2+} calpaína la cual degrada tanto a la α -espectrina como a la RCP, promoviendo el desensamble del complejo Rab11a/RCP. La degradación tanto de α -espectrina como el desensamble del complejo Rab11a/RCP son fundamentales para la internalización y degradación de PAR1 activado. Del mismo modo demostramos que la migración y

proliferación de las células del EPR se regula a través de la activación de la calpaína y el desensamble del complejo Rab11a/RCP. El estudio y esclarecimiento de los mecanismos que regulan la internalización de PAR1 en células del EPR es fundamental para el entendimiento, diagnóstico y prevención de enfermedades como la VRP.

8. Conclusiones

1. La estimulación con trombina promueve un incremento del Ca^{2+} intracelular cuyo origen es tanto de pozas intracelulares como extracelular
2. La trombina promueve la activación de la calpaína
3. La calpaína regula el desensamble del complejo Rab11a/RCP
4. El complejo Rab11a/RCP regula la internalización y degradación de PAR1
5. La calpaína regula la migración y proliferación de las células del EPR
6. Rab11a/RCP regulan la migración y prliferación de células del EPR

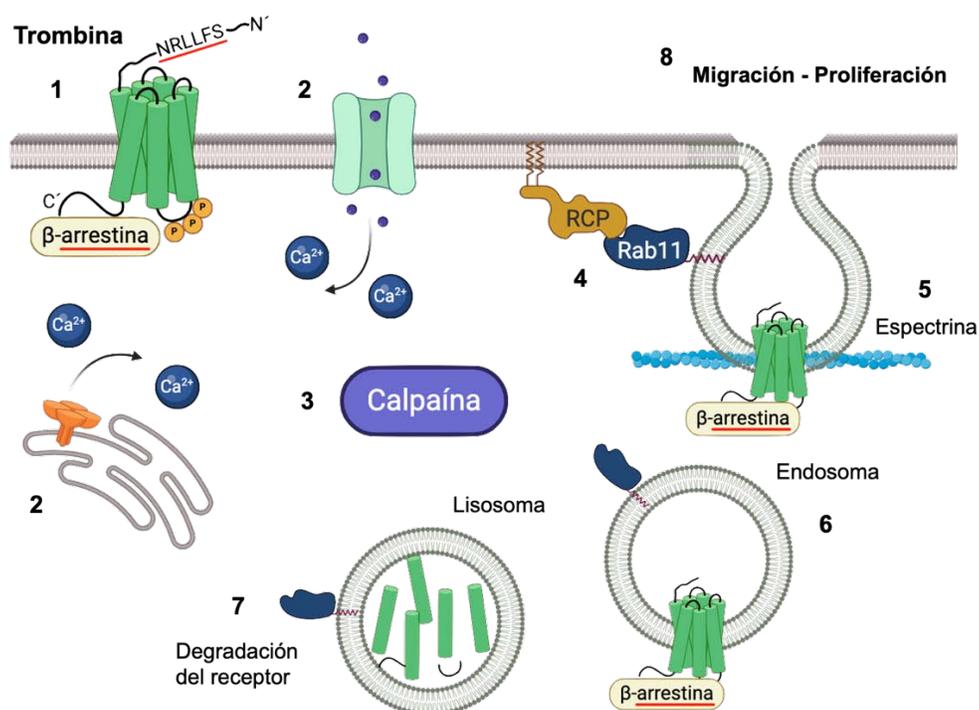


Fig. 27. Modelo de internalización de PAR1. El modelo de internalización de PAR1 propuesto en este trabajo implica que la activación de PAR1(1) promueve un incremento del Ca^{2+} intracelular (2), el cual tiene como consecuencia la activación de la calpaína (3). Del mismo modo demostramos que la calpaína regula el desensamble del complejo Rab11a-RCP (4) y la degradación de la α -espectrina (5), ambos procesos regulan la internalización (6) y subsecuente degradación de PAR1 (7). El conjunto de mecanismos descritos en este trabajo regulan la migración y proliferación de PAR1 (8).

9. Perspectivas

En este trabajo demostramos que la internalización y posterior degradación de PAR1 activado se relacionan con un incremento de la concentración intracelular de Ca^{2+} y la activación de la calpaína. Queda por explorar lo que sucede con el receptor PAR1 no activado. Es necesario evaluar si la internalización constitutiva de PAR1 se regula a través de los mismos mecanismos que PAR1 activado por trombina.

Del mismo modo, se propone evaluar los mecanismos de internalización y degradación de PAR2, PAR3 y PAR4 activados. Dado que la estimulación con los agonistas de estos receptores no incrementa la concentración intracelular de Ca^{2+} se propone que la internalización de estos receptores se regule de una manera distinta a la propuesta para PAR1.

10. Referencias bibliográficas

- (1) Soh; Dores, M. R.; Chen, B.; Trejo, J. Signal Transduction by Protease-Activated Receptors: PAR Signalling Paradigms. *British Journal of Pharmacology* **2010**, *160* (2), 191–203. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00705.x>.
- (2) Grimsey, N. J.; Coronel, L. J.; Cordova, I. C.; Trejo, J. Recycling and Endosomal Sorting of Protease-Activated Receptor-1 Is Distinctly Regulated by Rab11A and Rab11B Proteins. *J Biol Chem* **2016**, *291* (5), 2223–2236. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.702993>.
- (3) Kaneda, M. Signal Processing in the Mammalian Retina. *Journal of Nippon Medical School* **2013**, *80* (1), 16–24. <https://doi.org/10.1272/jnms.80.16>.
- (4) Wallace, V. A. Concise Review: Making a Retina-From the Building Blocks to Clinical Applications. *STEM CELLS* **2011**, *29* (3), 412–417. <https://doi.org/10.1002/stem.602>.
- (5) Strauss, O. The Retinal Pigment Epithelium in Visual Function. *Physiological reviews* **2005**, *85* (3), 845–881. <https://doi.org/10.1152/physrev.00021.2004>.
- (6) To, C. H.; Cheung, K. K.; Chiu, S. H.; Lai, H. M.; Lung, K. S. The Saturation Characteristics of Glucose Transport in Bovine Retinal Pigment Epithelium. *Yan ke xue bao = Eye science / "Yan ke xue bao" bian ji bu* **1998**, *14* (3), 126–129.
- (7) Katz, M. L.; Gao, C. L.; Stientjes, H. J. Regulation of the Interphotoreceptor Retinoid-Binding Protein Content of the Retina by Vitamin A. *Experimental eye research* **1993**, *57* (4), 393–401. <https://doi.org/10.1006/exer.1993.1140>.
- (8) Sparrow, J. R.; Hicks, D.; Hamel, C. P. The Retinal Pigment Epithelium in Health and Disease. *Current molecular medicine* **2010**, *10* (9), 802–823. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.021>. Secreted.
- (9) Constable, I. J.; Nagpal, M. Proliferative Vitreoretinopathy. In *Retina*; Elsevier, 2013; pp 1806–1825. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-0737-9.00107-7>.
- (10) Kwon, O. W.; Song, J. H.; Roh, M. I. Retinal Detachment and Proliferative Vitreoretinopathy. In *Developments in Ophthalmology*; Nguyen, Q. D., Rodrigues, E. B., Farah, M. E., Mieler, W. F., Do, D. V., Eds.; S. Karger AG, 2016; Vol. 55, pp 154–162. <https://doi.org/10.1159/000438972>.
- (11) Guidry, C. Proliferative Vitreoretinopathy. In *Ocular Disease*; Elsevier, 2010; pp 612–617. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-2983-7.00078-4>.
- (12) Simó, R.; Villarroel, M.; Corraliza, L.; Hernández, C.; Garcia-Ramírez, M. The Retinal Pigment Epithelium: Something More than a Constituent of the Blood-Retinal Barrier--Implications for the Pathogenesis of Diabetic Retinopathy. *Journal of biomedicine & biotechnology* **2010**, *2010*, 190724. <https://doi.org/10.1155/2010/190724>.
- (13) Coburn, P. S.; Wiskur, B. J.; Miller, F. C.; LaGrow, A. L.; Astley, R. A.; Elliott, M. H.; Callegan, M. C.; Enzmann, V.; Row, B.; Yamauchi, Y.; Kheirandish, L.; Gozal, D.; Kaplan, H.; McCall, M.; Kiuchi, K.; Yoshizawa, K.; Shikata, N.; Moriguchi, K.; Tsubura, A.; Campbell, M.; Humphries, P.; Schroder, S.; Palinski, W.; Schmid-Schonbein, G.; Miyamoto, K.; Hiroshiba, N.; Tsujikawa, A.; Ogura, Y.; Miyamoto, K.; Khosrof, S.; Bursell, S.; Funatsu, H.; Yamashita, H.; Sakata, K.; Noma, H.; Mimura, T.; Suzuki, M.; Fong, D.; Aiello, L.; Gardner, T.; King, G.; Blankenship, G.; Cavallerano, J.; 3rd, F. F.

Klein, R.; Neely, K.; Gardner, T.; Qaum, T.; Xu, Q.; Jousen, A.; Clemens, M.; Qin, W.; Miyamoto, K.; Takeda, M.; Mori, F.; Yoshida, A.; Takamiya, A.; Nakagomi, S.; Sato, E.; Asnaghi, V.; Gerhardinger, C.; Hoehn, T.; Adeboje, A.; Lorenzi, M.; Martin, P.; Roon, P.; Ells, T. Van; Ganapathy, V.; Smith, S.; Tso, M.; Cunha-Vaz, J.; Shih, C.; Jones, C.; Vinores, S.; Gadegbeku, C.; Campochiaro, P.; Green, W.; Weinberger, D.; Fink-Cohen, S.; Gatton, D.; Priel, E.; Yassur, Y.; Xu, H.; Le, Y.; Dahrouj, M.; Desjardins, D.; Liu, Y.; Crosson, C.; Ablonczy, Z.; Garcia-Ramírez, M.; Hernández, C.; Palomer, X.; Vázquez-Carrera, M.; Simó, R.; Wang, S.; Du, S.; Wu, Q.; Hu, J.; Li, T.; Jackson, T.; Paraskevopoulos, T.; Georgalas, I.; Ho, V.; Ho, L.; Ranchod, T.; Drenser, K.; Williams, G.; Garretson, B.; Durand, M.; Arevalo, J.; Jap, A.; Chee, S.; Zeballos, D.; Greenwald, M.; Wohl, L.; Sell, C.; Jackson, T.; Eykyn, S.; Graham, E.; Stanford, M.; Okada, A.; Johnson, R.; Liles, W.; D'Amico, D.; Baker, A.; Coburn, P.; Wiskur, B.; Christy, E.; Callegan, M.; Coburn, P.; Wiskur, B.; Astley, R.; Callegan, M.; Lin, J.; Siu, L.; Fung, C.; Tsou, H.; Wang, J.; Chen, C.; Park, S.; Rich, J.; Hanses, F.; Lee, J.; Wang, J.; Iacovelli, J.; Spencer, C.; Saint-Geniez, M.; Reagan, A.; Gu, X.; Hauck, S.; Ash, J.; Cao, G.; Thompson, T.; Moyer, A.; Ramadan, R.; Novosad, B.; Astley, R.; Callegan, M.; Cheung, A.; Eberhardt, K.; Chung, E.; Yeaman, M.; Sullam, P.; Ramos, M.; Bayer, A.; Jung, J.; Lee, J.; Yu, S.; Kim, Y.; Lee, J.; Sung, H.; Sheen, T.; Ebrahimi, C.; Hiemstra, I.; Barlow, S.; Peschel, A.; Doran, K.; Machalińska, A.; Lubiński, W.; Kłos, P.; Kawa, M.; Baumert, B.; Penkala, K.; Xia, H.; Krebs, M.; Kaushal, S.; Scott, E.; Pitkänen, L.; Ranta, V.; Moilanen, H.; Urtti, A.; Moyer, A.; Ramadan, R.; Thurman, J.; Burroughs, A.; Callegan, M.; Herbert, S.; Ziebandt, A.; Ohlsen, K.; Schäfer, T.; Hecker, M.; Albrecht, D.; Plata, K.; Rosato, A.; Wegrzyn, G.; Wirtz, C.; Witte, W.; Wolz, C.; Goerke, C.; Otto, M.; Löffler, B.; Hussain, M.; Grundmeier, M.; Brück, M.; Holzinger, D.; Varga, G.; Ibberson, C.; Jones, C.; Singh, S.; Wise, M.; Hart, M.; Zurawski, D.; Novick, R.; Booth, M.; Cheung, A.; Hatter, K.; Jett, B.; Callegan, M.; Gilmore, M.; Booth, M.; Hatter, K.; Miller, D.; Davis, J.; Kowalski, R.; Parke, D.; Callegan, M.; Booth, M.; Jett, B.; Gilmore, M.; Wiskur, B.; Hunt, J.; Callegan, M.; Novick, R.; Ramadan, R.; Ramirez, R.; Novosad, B.; Callegan, M.; Ramadan, R.; Moyer, A.; Callegan, M.; Bæk, K.; Frees, D.; Renzoni, A.; Otto, M.; Schneider, C.; Rasband, W.; Eliceiri, K.; Abramoff, M.; Magalhaes, P.; Ram, S. Bloodstream-To-Eye Infections Are Facilitated by Outer Blood-Retinal Barrier Dysfunction. *PLOS ONE* **2016**, *11* (5), e0154560.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154560>.

- (14) Cunha-Vaz, J.; Bernardes, R.; Lobo, C. Blood-Retinal Barrier. *European Journal of Ophthalmology* **2011**, *21* (Suppl. 6), 3–9. <https://doi.org/10.5301/EJO.2010.6049>.
- (15) Nagasaki, H.; Shinagawa, K.; Mochizuki, M. Risk Factors for Proliferative Vitreoretinopathy. *Progress in Retinal and Eye Research* **1998**, *17* (1), 77–98. [https://doi.org/10.1016/S1350-9462\(97\)00007-4](https://doi.org/10.1016/S1350-9462(97)00007-4).
- (16) Wiedemann, P. Growth Factors in Retinal Diseases: Proliferative Vitreoretinopathy, Proliferative Diabetic Retinopathy, and Retinal Degeneration. *Survey of ophthalmology* **1992**, *36* (5), 373–384.
- (17) 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* **2014**, *40*, 16–34.
<https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2013.12.006>.
- (18) Davie, E.; Kulman, J. An Overview of the Structure and Function of Thrombin. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* **2006**, *32* (S 1), 003–015.
<https://doi.org/10.1055/s-2006-939550>.
- (19) Bode, W. Structure and Interaction Modes of Thrombin. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* **2006**, *36* (2), 122–130. <https://doi.org/10.1016/j.bcmed.2005.12.027>.
- (20) Cera, E. Di. Thrombin. **2008**, *29*, 203–254.
<https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.01.001>.
- (21) Goldsack, N. R.; Chambers, R. C.; Dabbagh, K.; Laurent, J. Molecules in Focus Thrombin. **1998**, *30*, 641–646.
- (22) Wojtukiewicz, M. Z.; Hempel, D.; Sierko, E.; Tucker, S. C.; Honn, K. V. Protease-Activated Receptors (PARs)—Biology and Role in Cancer Invasion and Metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews* **2015**, *34* (4), 775–796.
<https://doi.org/10.1007/s10555-015-9599-4>.
- (23) Hackett, S. F.; Singer, J. H.; Leschey, K. H.; Campochiaro, P. A. Thrombin Is a Stimulator of Retinal Pigment Epithelial Cell Proliferation. *Experimental eye research* **1991**, *53* (1), 95–100.
- (24) 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. *Journal of Cellular Physiology* **2010**, *222* (2), 302–312. <https://doi.org/10.1002/jcp.21951>.
- (25) Palma-Nicolás, J. P.; López, E.; López-Colomé, A. M. Thrombin Stimulates RPE Cell Motility by PKC- δ - And NF- κ B-Dependent Gene Expression of MCP-1 and CINC-1/GRO Chemokines. *Journal of Cellular Biochemistry* **2010**, *110* (4), 948–959.
<https://doi.org/10.1002/jcb.22608>.
- (26) Pastor, J. C.; De La Rúa, E. R.; Martín, F. Proliferative Vitreoretinopathy: Risk Factors and Pathobiology. *Progress in Retinal and Eye Research* **2002**, *21* (1), 127–144.
[https://doi.org/10.1016/S1350-9462\(01\)00023-4](https://doi.org/10.1016/S1350-9462(01)00023-4).
- (27) Zhao, P.; Metcalf, M.; Bunnett, N. W. Biased Signaling of Protease-Activated Receptors. *Frontiers in Endocrinology* **2014**, *5*.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00067>.
- (28) Coughlin, S. R. Protease-Activated Receptors in Hemostasis, Thrombosis and Vascular Biology. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **2005**, *3* (8), 1800–1814.
<https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2005.01377.x>.
- (29) Mihara, K.; Ramachandran, R.; Saifeddine, M.; Hansen, K. K.; Renaux, B.; Polley, D.; Gibson, S.; Vanderboor, C.; Hollenberg, M. D. Thrombin-Mediated Direct Activation of Proteinase-Activated Receptor-2: Another Target for Thrombin Signaling. *Molecular Pharmacology* **2016**, *89* (5), 606–614.
<https://doi.org/10.1124/mol.115.102723>.
- (30) Macfarlane, S. R.; Seatter, M. J.; Kanke, T.; Hunter, G. D.; Plevin, R. Proteinase-Activated Receptors. *Pharmacological reviews* **2001**, *53* (2), 245–282.
- (31) Trejo, J. Protease-Activated Receptors: New Concepts in Regulation of G Protein-Coupled Receptor Signaling and Trafficking. *The Journal of pharmacology and*

- experimental therapeutics* **2003**, 307 (2), 437–442.
<https://doi.org/10.1124/jpet.103.052100>.
- (32) Hollenberg, M. D. International Union of Pharmacology. XXVIII. Proteinase-Activated Receptors. *Pharmacological Reviews* **2002**, 54 (2), 203–217.
<https://doi.org/10.1124/pr.54.2.203>.
- (33) Zhang, C.; Srinivasan, Y.; Arlow, D. H.; Fung, J. J.; Palmer, D.; Zheng, Y.; Green, H. F.; Pandey, A.; Dror, R. O.; Shaw, D. E.; Weis, W. I.; Coughlin, S. R.; Kobilka, B. K. High-Resolution Crystal Structure of Human Protease-Activated Receptor 1. *Nature* **2012**, 492 (7429), 387–392. <https://doi.org/10.1038/nature11701>.
- (34) Ruiz-Loredo, A. Y.; López, E.; López-Colomé, A. M. Thrombin Promotes Actin Stress Fiber Formation in RPE through Rho/ROCK-Mediated MLC Phosphorylation. *Journal of Cellular Physiology* **2011**, 226 (2), 414–423. <https://doi.org/10.1002/jcp.22347>.
- (35) Ramachandran, R.; Hollenberg, M. D. Proteinases and Signalling: Pathophysiological and Therapeutic Implications via PARs and More: Proteinases, Signalling and Pathophysiology. *British Journal of Pharmacology* **2009**, 153 (S1), S263–S282.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707507>.
- (36) Vaidyula, V. R.; Rao, A. K. Role of Galphaq and Phospholipase C-Beta2 in Human Platelets Activation by Thrombin Receptors PAR1 and PAR4: Studies in Human Platelets Deficient in Galphaq and Phospholipase C-Beta2. *British journal of haematology* **2003**, 121 (3), 491–496.
- (37) Puro, D. G.; Stuenkel, E. L. Thrombin-Induced Inhibition of Potassium Currents in Human Retinal Glial (Müller) Cells. *The Journal of physiology* **1995**, 485 (Pt 2), 337–348.
- (38) Kaufmann, R.; Rahn, S.; Pollrich, K.; Hertel, J.; Dittmar, Y.; Hommann, M.; Henklein, P.; Biskup, C.; Westermann, M.; Hollenberg, M. D.; Settmacher, U. Thrombin-Mediated Hepatocellular Carcinoma Cell Migration: Cooperative Action via Proteinase-Activated Receptors 1 and 4. *Journal of Cellular Physiology* **2007**, 211 (3), 699–707. <https://doi.org/10.1002/jcp.21027>.
- (39) Luo, W.; Wang, Y.; Reiser, G. Two Types of Protease-Activated Receptors (PAR-1 and PAR-2) Mediate Calcium Signaling in Rat Retinal Ganglion Cells RGC-5. *Brain research* **2005**, 1047 (2), 159–167. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.04.040>.
- (40) Narayan, S.; Prasanna, G.; Tchedre, K.; Krishnamoorthy, R.; Yorio, T. Thrombin-Induced Endothelin-1 Synthesis and Secretion in Retinal Pigment Epithelial Cells Is Rho Kinase Dependent. *Journal of ocular pharmacology and therapeutics : the official journal of the Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics* **2010**, 26 (5), 389–397. <https://doi.org/10.1089/jop.2010.0072>.
- (41) Yang, I.-H.; Tsai, Y.-T.; Chiu, S.-J.; Liu, L.-T.; Lee, H.-H.; Hou, M.-F.; Hsu, W.-L.; Chen, B.-K.; Chang, W.-C. Involvement of STIM1 and Orai1 in EGF-Mediated Cell Growth in Retinal Pigment Epithelial Cells. *Journal of biomedical science* **2013**, 20 (1), 41.
<https://doi.org/10.1186/1423-0127-20-41>.
- (42) Smith-Thomas, L.; Haycock, J. W.; Metcalfe, R.; Boulton, M.; Ellis, S.; Rennie, I. G.; Richardson, P. S.; Palmer, I.; Parsons, M. A.; Mac Neil, S. Involvement of Calcium in Retinal Pigment Epithelial Cell Proliferation and Pigmentation. *Current eye research* **1998**, 17 (8), 813–822.

- (43) Angiolillo, D. J.; Capodanno, D.; Goto, S. Platelet Thrombin Receptor Antagonism and Atherothrombosis. *European Heart Journal* **2010**, *31* (1), 17–28. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehp504>.
- (44) Hanyaloglu, A. C.; Zastrow, M. von. Regulation of GPCRs by Endocytic Membrane Trafficking and Its Potential Implications. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **2008**, *48* (1), 537–568. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.48.113006.094830>.
- (45) Horgan, C. P.; McCaffrey, M. W. The Dynamic Rab11-FIPs. *Biochemical Society Transactions* **2009**, *37* (5), 1032–1036. <https://doi.org/10.1042/BST0371032>.
- (46) Paing, M. M.; Johnston, C. A.; Siderovski, D. P.; Trejo, J. Clathrin Adaptor AP2 Regulates Thrombin Receptor Constitutive Internalization and Endothelial Cell Resensitization. *Molecular and cellular biology* **2006**, *26* (8), 3231–3242. <https://doi.org/10.1128/MCB.26.8.3231-3242.2006>.
- (47) Hein, L.; Ishii, K.; Coughlin, S. R.; Kobilka, B. K. Intracellular Targeting and Trafficking of Thrombin Receptors. A Novel Mechanism for Resensitization of a G Protein-Coupled Receptor. *The Journal of biological chemistry* **1994**, *269* (44), 27719–27726.
- (48) Shapiro, M. J.; Weiss, E. J.; Faruqi, T. R.; Coughlin, S. R. Protease-Activated Receptors 1 and 4 Are Shut Off with Distinct Kinetics after Activation by Thrombin. *Journal of Biological Chemistry* **2000**, *275* (33), 25216–25221. <https://doi.org/10.1074/jbc.M004589200>.
- (49) Paing, M. M.; Stutts, A. B.; Kohout, T. A.; Lefkowitz, R. J.; Trejo, J. β -Arrestins Regulate Protease-Activated Receptor-1 Desensitization but Not Internalization or Down-Regulation. *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277* (2), 1292–1300. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109160200>.
- (50) Zimmerman, U. J.; Boring, L.; Pak, J. H.; Mukerjee, N.; Wang, K. K. The Calpain Small Subunit Gene Is Essential: Its Inactivation Results in Embryonic Lethality. *IUBMB life* **2000**, *50*, 63–68. <https://doi.org/10.1080/15216540050176610>.
- (51) Khorchid, A.; Ikura, M. How Calpain Is Activated by Calcium. *Nature Structural Biology* **2002**, *9* (4), 239–241. <https://doi.org/10.1038/nsb0402-239>.
- (52) Barnes, J. A.; Gomes, A. V. PEST Sequences in Calmodulin-Binding Proteins. 11.
- (53) Goll, D. E.; Thompson, V. F.; Li, H.; Wei, W. E. I.; Cong, J. The Calpain System. **2003**, *1990* (284), 731–801.
- (54) Sato, K.; Saito, Y.; Kawashima, S. Identification and Characterization of Membrane-Bound Calpains in Clathrin-Coated Vesicles from Bovine Brain. *European Journal of Biochemistry* **1995**, *230* (1), 25–31. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1995.tb20529.x>.
- (55) Maemoto, Y.; Ono, Y.; Kiso, S.; Shibata, H.; Takahara, T.; Sorimachi, H.; Maki, M. Involvement of Calpain-7 in Epidermal Growth Factor Receptor Degradation via the Endosomal Sorting Pathway. *FEBS Journal* **2014**, *281* (16), 3642–3655. <https://doi.org/10.1111/febs.12886>.
- (56) Rudinskiy, N.; Grishchuk, Y.; Vaslin, A.; Puyal, J.; Delacourte, A.; Hirling, H.; Clarke, P. G. H.; Luthi-Carter, R. Calpain Hydrolysis of α - and β 2-Adaptins Decreases Clathrin-Dependent Endocytosis and May Promote Neurodegeneration. *Journal of Biological Chemistry* **2009**, *284* (18), 12447–12458. <https://doi.org/10.1074/jbc.M804740200>.

- (57) Averna, M.; Stifanese, R.; Grosso, R.; Pedrazzi, M.; De Tullio, R.; Salamino, F.; Pontremoli, S.; Melloni, E. Role of Calpain in the Regulation of CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) Turnover. *The Biochemical journal* **2010**, *430* (2), 255–263. <https://doi.org/10.1042/BJ20100344>.
- (58) Kamal, A.; Ying, Y. S.; Anderson, R. G. W. Annexin VI-Mediated Loss of Spectrin during Coated Pit Budding Is Coupled to Delivery of LDL to Lysosomes. *Journal of Cell Biology* **1998**, *142* (4), 937–947. <https://doi.org/10.1083/jcb.142.4.937>.
- (59) Machnicka, B.; Grochowalska, R.; Bogusławska, D. M.; Sikorski, A. F.; Lecomte, M. C. Spectrin-Based Skeleton as an Actor in Cell Signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences* **2012**, *69* (2), 191–201. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0804-5>.
- (60) Kruger, W. A.; Monteith, G. R.; Poronnik, P. NHERF-1 Regulation of EGF and Neurotensin Signalling in HT-29 Epithelial Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2013**, *432* (4), 568–573. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.02.047>.
- (61) Pons, M.; Grewal, T.; Rius, E.; Schnitgerhans, T.; Jäckle, S.; Enrich, C. Evidence for the Involvement of Annexin 6 in the Trafficking between the Endocytic Compartment and Lysosomes. *Experimental cell research* **2001**, *269* (1), 13–22. <https://doi.org/10.1006/excr.2001.5268>.
- (62) Tjota, M.; Lee, S.-K.; Wu, J.; Williams, J. a; Khanna, M. R.; Thomas, G. H. Annexin B9 Binds to {beta}H-Spectrin and Is Required for Multivesicular Body Function in Drosophila. *Journal of cell science* **2011**, *124* (Pt 17), 2914–2926. <https://doi.org/10.1242/jcs.078667>.
- (63) Seachrist, J. L.; Ferguson, S. S. G. Regulation of G Protein-Coupled Receptor Endocytosis and Trafficking by Rab GTPases. **2003**, *74*, 225–235. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2003.09.009>.
- (64) Müller, M. P.; Goody, R. S. Molecular Control of Rab Activity by GEFs, GAPs and GDI. *Small GTPases* **2017**, 00–00. <https://doi.org/10.1080/21541248.2016.1276999>.
- (65) Seixas, E.; Barros, M.; Seabra, M. C.; Barral, D. C. Rab and Arf Proteins in Genetic Diseases. **2013**, 871–885. <https://doi.org/10.1111/tra.12072>.
- (66) Hutagalung, A. H.; Novick, P. J. Role of Rab GTPases in Membrane Traffic and Cell Physiology. *Physiological reviews* **2011**, *91* (1), 119–149. <https://doi.org/10.1152/physrev.00059.2009>.
- (67) Cullis, D. N.; Philip, B.; Baleja, J. D.; Feig, L. A. Rab11-FIP2, an Adaptor Protein Connecting Cellular Components Involved in Internalization and Recycling of Epidermal Growth Factor Receptors. *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277* (51), 49158–49166. <https://doi.org/10.1074/jbc.M206316200>.
- (68) Amaya, C.; Fader, C. M.; Colombo, M. I. Autophagy and Proteins Involved in Vesicular Trafficking. *FEBS Letters* **2015**, *589* (22), 3343–3353. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.09.021>.
- (69) Amaya, C.; Fader, C. M.; Colombo, M. I. Autophagy and Proteins Involved in Vesicular Trafficking. *FEBS Letters* **2015**, *589* (22), 3343–3353. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.09.021>.
- (70) Stenmark, H. Rab GTPases as Coordinators of Vesicle Traffic. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2009**, *10* (8), 513–525. <https://doi.org/10.1038/nrm2728>.

- (71) Guichard, A.; Nizet, V.; Bier, E. RAB11-Mediated Trafficking in Host–Pathogen Interactions. *Nature Reviews Microbiology* **2014**, *12* (9), 624–634. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3325>.
- (72) Baetz, N. W. and; Goldenring, J. R. Rab11-Family Interacting Proteins Define Spatially and Temporally Distinct Regions within the Dynamic Rab11a-Dependent Recycling System. *Molecular Biology of the Cell* **2013**, *24* (5), 643–658. <https://doi.org/10.1091/mbc.E12-09-0659>.
- (73) Marie, N.; Lindsay, A. J.; McCaffrey, M. W. Rab Coupling Protein Is Selectively Degraded by Calpain in a Ca²⁺-Dependent Manner. *Biochem J* **2005**, *389* (Pt 1), 223–231. <https://doi.org/10.1042/BJ20042116>.
- (74) Lall, P.; Lindsay, A. J.; Hanscom, S.; Kecman, T.; Taglauer, E. S.; McVeigh, U. M.; Franklin, E.; McCaffrey, M. W.; Khan, A. R. Structure-Function Analyses of the Interactions between Rab11 and Rab14 Small GTPases with Their Shared Effector Rab Coupling Protein (RCP). *J Biol Chem* **2015**, *290* (30), 18817–18832. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.612366>.
- (75) Lindsay, A. J.; McCaffrey, M. W. Rab11-FIP2 Functions in Transferrin Recycling and Associates with Endosomal Membranes via Its COOH-Terminal Domain. *The Journal of biological chemistry* **2002**, *277* (30), 27193–27199. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200757200>.
- (76) Fan, G.-H.; Lapierre, L. A.; Goldenring, J. R.; Sai, J.; Richmond, A. Rab11-Family Interacting Protein 2 and Myosin Vb Are Required for CXCR2 Recycling and Receptor-Mediated Chemotaxis. *Molecular Biology of the Cell* **2004**, *15* (5), 2456–2469. <https://doi.org/10.1091/mbc.E03-09-0706>.
- (77) Dong, W.; Qin, G.; Shen, R. Rab11-FIP2 Promotes the Metastasis of Gastric Cancer Cells. *International Journal of Cancer* **2016**, *138* (7), 1680–1688. <https://doi.org/10.1002/ijc.29899>.
- (78) Matthies, H. J. G.; Moore, J. L.; Saunders, C.; Matthies, D. S.; Lapierre, L. A.; Goldenring, J. R.; Blakely, R. D.; Galli, A. Rab11 Supports Amphetamine-Stimulated Norepinephrine Transporter Trafficking. *Journal of Neuroscience* **2010**, *30* (23), 7863–7877. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4574-09.2010>.
- (79) Eva, R.; Dassie, E.; Caswell, P. T.; Dick, G.; French-Constant, C.; Norman, J. C.; Fawcett, J. W. Rab11 and Its Effector Rab Coupling Protein Contribute to the Trafficking of B1 Integrins during Axon Growth in Adult Dorsal Root Ganglion Neurons and PC12 Cells. *J. Neurosci.* **2010**, *30* (35), 11654–11669. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2425-10.2010>.
- (80) Dunn, K. C.; Aotaki-Keen, a E.; Putkey, F. R.; Hjelmeland, L. M. ARPE-19, a Human Retinal Pigment Epithelial Cell Line with Differentiated Properties. *Experimental eye research* **1996**, *62* (2), 155–169. <https://doi.org/10.1006/exer.1996.0020>.
- (81) Peden, A.; Schonteich, E.; Chun, J.; Junutula, J. R.; Scheller, R. H.; Prekeris, R. The RCP–Rab11 Complex Regulates Endocytic Protein Sorting. *MBoC* **2004**, *15* (8), 3530–3541. <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-12-0918>.
- (82) Hachet-Haas, M.; Converset, N.; Marchal, O.; Matthes, H.; Gioria, S.; Galzi, J.-L.; Lecat, S. FRET and Colocalization Analyzer—A Method to Validate Measurements of Sensitized Emission FRET Acquired by Confocal Microscopy and Available as an

- ImageJ Plug-In. *Microscopy Research and Technique* **2006**, 69 (12), 941–956. <https://doi.org/10.1002/jemt.20376>.
- (83) Cordeiro, S.; Strauss, O. Expression of Orai Genes and I(CRAC) Activation in the Human Retinal Pigment Epithelium. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* **2011**, 249 (1), 47–54. <https://doi.org/10.1007/s00417-010-1445-3>.
- (84) Seyb, K.; Ni, J.; Huang, M.; Schuman, E. L. I.; Neurodegeneration, D. I. N.; Neurodegeneration, F. O. R.; Hospital, S.; Pharmacology, O. F. Screen for Calpain Inhibitors Using a Cell - Based , High - Throughput Assay Calpain Assay. **2007**, 6–8.
- (85) Parrales, A.; López, E.; Lee-Rivera, I.; L??pez-Colom??, A. M. ERK1/2-Dependent Activation of mTOR/mTORC1/p70S6K Regulates Thrombin-Induced RPE Cell Proliferation. *Cellular Signalling* **2013**, 25 (4), 829–838. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.12.023>.
- (86) Gómez, N. M.; Tamm, E. R.; Strauss, O. Role of Bestrophin-1 in Store-Operated Calcium Entry in Retinal Pigment Epithelium. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* **2013**, 465 (4), 481–495. <https://doi.org/10.1007/s00424-012-1181-0>.
- (87) Wimmers, S.; Coepicus, L.; Rosenthal, R.; Strauss, O. Expression Profile of Voltage-Dependent Ca²⁺ Channel Subunits in the Human Retinal Pigment Epithelium. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **2008**, 246 (5), 685–692. <https://doi.org/10.1007/s00417-008-0778-7>.
- (88) Wimmers, S.; Strauss, O. Basal Calcium Entry in Retinal Pigment Epithelial Cells Is Mediated by TRPC Channels. *Investigative ophthalmology & visual science* **2007**, 48 (12), 5767–5772. <https://doi.org/10.1167/iovs.07-0412>.
- (89) Seminario-Vidal, L.; Kreda, S.; Jones, L.; O'Neal, W.; Trejo, J. A.; Boucher, R. C.; Lazarowski, E. R. Thrombin Promotes Release of ATP from Lung Epithelial Cells through Coordinated Activation of Rho- and Ca²⁺ -Dependent Signaling Pathways. *Journal of Biological Chemistry* **2009**, 284 (31), 20638–20648. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.004762>.
- (90) Ostrowska, E.; Reiser, G. The Protease-Activated Receptor-3 (PAR-3) Can Signal Autonomously to Induce Interleukin-8 Release. *Cellular and Molecular Life Sciences* **2008**, 65 (6), 970–981. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-7555-y>.
- (91) Tsai, J. C.; Lin, Y. W.; Huang, C. Y.; Lin, C. Y.; Tsai, Y. T.; Shih, C. M.; Lee, C. Y.; Chen, Y. H.; Li, C. Y.; Chang, N. C.; Lin, F. Y.; Tsai, C. S. The Role of Calpain-Myosin 9-Rab7b Pathway in Mediating the Expression of Toll-like Receptor 4 in Platelets: A Novel Mechanism Involved in ??-Granules Trafficking. *PLoS ONE* **2014**, 9 (1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085833>.
- (92) Fukuda, S.; Harada, K.; Kunitatsu, M.; Sakabe, T.; Yoshida, K. Postischemic Reperfusion Induces Alpha-Fodrin Proteolysis by m-Calpain in the Synaptosome and Nucleus in Rat Brain. *Journal of neurochemistry* **1998**, 70 (6), 2526–2532.
- (93) Sato, K.; Hattori, S.; Irie, S.; Sorimachi, H.; Inomata, M.; Kawashima, S. Degradation of Fodrin by M-Calpain in Fibroblasts Adhering to Fibrillar Collagen I Gel. *Journal of Biochemistry* **2004**, 136 (6), 777–785. <https://doi.org/10.1093/jb/mvh187>.

11. Artículos publicados

Hindawi
International Journal of Cell Biology
Volume 2017, Article ID 1908310, 14 pages
<https://doi.org/10.1155/2017/1908310>



Research Article

Thrombin-Induced Calpain Activation Promotes Protease-Activated Receptor 1 Internalization

Alejandro Alvarez-Arce, Irene Lee-Rivera, Edith López, Arturo Hernández-Cruz, and Ana María López-Colomé

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

Correspondence should be addressed to Ana María López-Colomé; acolome@ifc.unam.mx

Received 16 July 2017; Revised 2 October 2017; Accepted 15 October 2017; Published 9 November 2017

Academic Editor: Richard Tucker

Copyright © 2017 Alejandro Alvarez-Arce et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The serine protease thrombin activates Protease-Activated Receptors (PARs), a family of G-protein-coupled receptors (GPCRs) activated by the proteolytic cleavage of their extracellular N-terminal domain. Four members of this family have been identified: PAR1–4. The activation of Protease-Activated Receptor 1 (PAR1), the prototype of this receptor family, leads to an increase in intracellular Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_i$) mediated by G_{q11} α coupling and phospholipase C (PLC) activation. We have previously shown that the stimulation of PAR1 by thrombin promotes intracellular signaling leading to RPE cell transformation, proliferation, and migration which characterize fibroproliferative eye diseases leading to blindness. Within this context, the elucidation of the mechanisms involved in PAR1 inactivation is of utmost importance. Due to the irreversible nature of PAR1 activation, its inactivation must be efficiently regulated in order to terminate signaling. Using ARPE-19 human RPE cell line, we characterized thrombin-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase and demonstrated the calcium-dependent activation of μ -calpain mediated by PAR1. Calpains are a family of calcium-activated cysteine proteases involved in multiple cellular processes including the internalization of membrane proteins through clathrin-coated vesicles. We demonstrated that PAR1-induced calpain activation results in the degradation of α -spectrin by calpain, essential for receptor endocytosis, and the consequent decrease in PAR1 membrane expression. Collectively, the present results identify a novel μ -calpain-dependent mechanism for PAR1 inactivation following exposure to thrombin.

1. Introduction

The retinal pigment epithelium (RPE) is a monolayer of differentiated, quiescent cells located between the neural retina and the choroid. The RPE is the predominant component of the outer blood-retina barrier (BRB) and plays an essential role in the maintenance of the functional and structural integrity of the neural retina required for visual function. Among its functions, the RPE is involved in the transepithelial transport of nutrients, the storage and metabolism of vitamin A derivatives, the renewal of photoreceptor outer segments, and the ionic homeostasis of the subretinal space [1].

Under pathological conditions involving the alteration of the BRB due to ocular trauma, diabetic retinopathy, retinal detachment, retinal hemorrhage, or, importantly, retinal

surgery, the RPE is exposed to serum-contained growth factors and proinflammatory agents including thrombin, generated by the activation of the coagulation cascade. Thrombin has been shown to promote the release of cytokines, chemokines, and growth factors by RPE cells [2]. This results in the proliferation, dedifferentiation, and migration of RPE and glia cells to the vitreous and the subsequent assembly of contractile membranes on both retinal surfaces, thus promoting retinal detachment and, eventually, the loss of vision [3]. The identification of molecular targets for the prevention of this outcome is still lacking.

Thrombin-induced intracellular signaling is triggered by Protease-Activated Receptors (PARs), a family of G-protein-coupled receptors (GPCRs) activated by the proteolytic cleavage of the extracellular N-terminal domain, which unmarks a

fresh N-terminal sequence that functions as an intramolecular ligand. Four members of this family have been identified: PAR1, PAR3, and PAR4 activated by thrombin and PAR2 mainly activated by trypsin, tryptase, and other trypsin-like proteases, in addition to high concentrations of thrombin [4]. PAR1 is the prototype of this receptor family, and its cleavage by thrombin at the Arg41-Ser42 bond exposes a new N-terminus (42 SFLLRN 47) that acts as a tethered ligand which binds intramolecularly to the second extracellular loop of the receptor and triggers signaling. Synthetic ligands corresponding to the cleaved N-terminus can displace the tethered ligand from the binding site and fully activate PAR1 in an intermolecular mode. The coupling of PARs to GPCR $G\alpha$ subunits $G_{q11}\alpha$, $G_{12/13}\alpha$, and $G_i\alpha$ has been linked to a wide array of physiologic responses. Particularly, PAR1 coupling to $G_{q11}\alpha$ activates phospholipase C- β (PLC- β), which catalyzes the formation of inositol 1,4,5-trisphosphate (IP $_3$) and diacylglycerol (DAG), leading to an increase in intracellular Ca $^{+2}$ concentration ([Ca $^{+2}$] $_i$) [5].

Due to the irreversible nature of PAR1 activation by thrombin, PAR1 signaling and inactivation must be tightly regulated [6, 7]. Similar to classic GPCRs, PAR1 is rapidly desensitized by G-protein-coupled receptor kinase-mediated phosphorylation [8, 9] and β -arrestin binding, which uncouples the receptor from heterotrimeric G protein signaling [10]. Activated PAR1 is then internalized from the cell surface, sorted directly to lysosomes and degraded, which prevents continued signaling by previously activated receptors [11, 12]. These findings indicate that internalization and lysosomal sorting of PAR1 are important for regulating the magnitude and duration of G protein signaling. Studies by Paing et al. (2006) on this matter have shown that although β -arrestin binding is mainly responsible for PAR1 desensitization, it is not required for receptor internalization. Moreover, the mechanisms that control constitutive internalization of native, uncleaved receptors appear to differ from those controlling the internalization of activated receptors. Nonactivated PAR1 cycles constitutively between the plasma membrane and intracellular stores, thereby replenishing the cell surface following thrombin exposure, leading to rapid resensitization to thrombin signaling independent of de novo receptor synthesis [13].

Both the constitutive internalization and the internalization of activated PAR1 proceed through clathrin-coated vesicles [13–15]. Previous studies have shown that the clathrin adaptor protein complex 2 (AP-2) is essential for constitutive receptor internalization and cellular recovery of thrombin signaling [13]. The clathrin adaptor AP-2 is a heterotetrameric complex formed by α , β 2, μ 2, and σ 2 adaptin subunits and has critical functions in the assembly and recruitment of cargo proteins to clathrin-coated pits. The μ 2-adaptin subunit of AP-2 binds directly to tyrosine-based motifs within the cytoplasmic- (C-) tail domain of a number of GPCRs including PAR1 [16] and is required for constitutive internalization and cellular resensitization to thrombin [13]. AP-2 also regulates activated PAR1 internalization via recognition of

distal C-tail phosphorylation sites rather than the canonical tyrosine-based motif and has been shown to depend on epsin-1 interaction with ubiquitinated PAR1 [13, 17]. The mechanism by which activated PAR1 is recruited to clathrin-coated pits is presently not clear, and whether internalization of PAR2, PAR3, and PAR4 proceeds through the same pathway as PAR1 or is regulated by distinct mechanisms remains to be established.

Calpains are a family of calcium-activated cysteine proteases that catalyze the limited proteolysis of a number of cellular proteins in eukaryotes [18, 19]. To date, more than a dozen calpain isoforms and multiple splice variants have been identified [20]. The best-characterized members of this family, μ -calpain (calpain 1) and m-calpain (calpain 2), are activated, respectively, by micro- and millimolar Ca $^{2+}$ concentrations [21]. Both these calpains include a 78–80 kDa catalytic subunit encoded by the CAPN1 or CAPN2 genes [20] and share a common 28 kDa regulatory subunit (CAPNS1; formerly CAPN4) [22]. Calcium binding to EF-hand calcium binding domains present in both calpain subunits results in conformational changes which expose the catalytic domain in the large subunit, thus activating calpain [18]. μ -Calpain is present in an inactive form in the cytoplasm of non-stimulated cells. Upon stimulation, the increase in [Ca $^{+2}$] $_i$ within the low micromolar range induces μ -calpain activation by autoprolysis of the N-terminus, which exposes the catalytic site [23].

Calpains are involved in multiple cellular processes such as cell migration, actin cytoskeleton remodeling, and apoptosis [18]. Among these functions, calpains regulate the internalization of membrane proteins through clathrin-coated vesicles [24], such as epidermal growth factor receptor (EGFR) [25], transferrin receptor (RTF) [26], Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) [27], and Low Density Lipoprotein (LDL) [28] among others. This process has been shown to require the proteolysis of distinct structural proteins, including the cytoskeletal protein α -spectrin by calcium-activated μ -calpain [28, 29].

Using human RPE-derived ARPE-19 cell line, we analyzed thrombin-induced [Ca $^{+2}$] $_i$ increase and demonstrated that the calcium-dependent activation of μ -calpain and the subsequent degradation of α -spectrin by calpain significantly decrease PAR1 expression at the cell membrane. These findings indicate that PAR1 inactivation by internalization is controlled by specific mechanisms, distinct from those promoting RPE cell transformation, and further support a role for thrombin in this process.

2. Materials and Methods

2.1. Reagents. All reagents used were cell culture grade. Thrombin, PAR1 agonist (SFLLRNPNDKYEPF), and anti- α -spectrin antibody (MAB1266) were purchased from Calbiochem/EMD Millipore (Billerica, MA, USA). PAR 3 (SFNGGP-NH $_2$) and PAR4 (GYPGKF-NH $_2$) agonist peptides were from Bachem (Torrance, CA, USA). PPACK (D-phenylalanyl-prolyl-arginyl chloromethyl ketone) was from

Enzo Life Sciences (New York, NY, USA). DMEM/F12 was from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). Fetal bovine serum (FBS), Fluo-4 AM, Thapsigargin, EGTA, and Lanthanum (III) Chloride were purchased from Invitrogen, Life Sciences (Carlsbad, CA, USA). Calpain-Glo Protease Assay was from Promega (Madison WI, USA), and Epoxomicin and PARI-Alexa 488 antibody (FAB3855G) were from R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN USA). Anti-PARI antibody (SCI3503) was purchased from Santa Cruz Biotechnology (CA, USA). CY3 anti-mouse secondary antibody (115-165-003) was from Jackson ImmunoResearch (PA, USA). BAPTA-AM, acetyl-calpastatin, and PDI50606 were from Trocrist Bioscience (Minneapolis, MN, USA). All other reagents were from Sigma Aldrich (St. Louis MO, USA).

2.2. Cell Culture. ARPE-19 cell line derived from human RPE was used throughout (ATCC® CRL-2302™). Cells were grown in DMEM/F12 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) supplemented with 15 mM HEPES, 14.2 mM NaHCO₃, 0.5 mM sodium pyruvate, 0.005% penicillin, streptomycin, 0.01% neomycin, and 10% fetal bovine serum (FBS) pH 7.4. Cells were subcultured as suggested by ATCC. For all assays, cultures were serum-deprived for 24 hours prior to the experiment. Unless otherwise specified, experiments were carried in DMEM/F12 medium without FBS.

2.3. Measurement of Calpain Activity. Calpain-Glo Protease Assay (Promega, Madison, WI, USA) kit was used to determine the activity of m- and μ -calpain [30]. Cells were incubated for 30 minutes with 100 nM epoxomicin in order to inhibit proteasome activity. Cultures were then washed with phosphate buffered saline (PBS) and incubated for one hour with Suc-LLVY substrate peptide diluted with Calpain-Glo Buffer at 37°C. Cells were rinsed with PBS to remove unincorporated peptide and subsequently stimulated with 10 nM thrombin or 2.5 μ M PARI-Agonist Peptide (AP) in DMEM/F12 medium at room temperature for 1 minute. The agonists were removed with PBS and cells were permeabilized using PBS 0.9% Triton X-100. Luciferin detection reagent (Promega, Madison, WI, USA) was then added for 5 min and luminescence was measured in a plate reader (Synergy HT, BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA). Measurements for each experimental condition were registered at 20 s intervals for 2 minutes. Results are expressed as percent Relative Luminescence Units (% RLU). Data are the mean \pm SEM of three independent experiments. Values for nonstimulated cultures maintained in serum-free DMEM/F12 (negative control) were set as 100%.

2.4. Anti- α -Spectrin Western Blot. Degradation of α -spectrin by calpain is one of the first events required for receptor internalization. Cells were stimulated for 1 minute with thrombin or PARI-AP in serum-free DMEM/F12 at room temperature. Cultures were then rinsed with PBS and incubated for 15 minutes at 37°C in serum-free DMEM/F12. Cells were lysed in 50 mM Tris-HCl pH = 7.4, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 1% CHAPS, 0.5% NP40, 0.1% BSA, 10% protease inhibitor cocktail (Sigma Aldrich P8340),

40 mM β -glycerophosphate, and 10 mM sodium pyrophosphate. Protein concentration was determined using bicinchoninic acid assay (Sigma Aldrich) and 20 μ g of the total protein was used for protein immunodetection analysis. The lysates were solubilized in Laemmli buffer (0.75 mM Tris-HCl; pH 8.8, 5% SDS, 20% glycerol, 0.01% bromophenol blue, 10% β mercaptoethanol), boiled for 5 min, resolved by SDS/PAGE (6.5%), and transferred onto nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences). After blocking for 1 h at room temperature with 7.5% nonfat milk in Tween TBS, the membranes were probed with primary antibodies against α -spectrin (1:4000 in blocking buffer) overnight at 4°C. Secondary HRP-conjugated antibody (1:5000) was incubated for 1 h and membranes were developed using the Luminata Forte Western Chemiluminescent Substrate (Millipore, Billerica, MA, USA). Kodak® film images were digitized using an Alpha Digi-Doc system (Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA), and densitometry analysis was performed using the ImageJ Software and normalized to control values. GAPDH immunodetection was used as loading control.

2.5. Intracellular Ca²⁺ Concentration ([Ca²⁺]_i) Measurement. [Ca²⁺]_i was determined as previously described [31]. Briefly, coverslips containing ARPE-19 cells were incubated with 2 μ M of the cell-permeable fluorescent Ca²⁺ indicator fluo-4 AM (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) for 35 min at room temperature in Krebs-Ringer-Bicarbonate buffer (KRB; 118 mM NaCl; 2 mM KH₂PO₄; 4.7 mM KCl; 2.5 mM CaCl₂; 1.4 mM MgSO₄; 25 mM NaHCO₃; 5.6 mM Glucose; pH 7.4). The coverslips were placed in a recording chamber (Mod. RC-25; Warner Instruments, Hamden, CT, USA) attached to the stage of an upright microscope (Nikon Eclipse 80i; Nikon Corp., Tokyo, Japan) and continuously superfused (3 ml/min) with KRB applied to the recording chamber by gravity-fed superfusion. Fluo-4 was excited at 488 nm with monochromatic light from an argon laser (Laser Physics, Reliant 100 s488, West Jordan, UT), coupled to a Yokogawa spin-disk confocal scan head (CSU10B, Yokogawa Electronic Co., Tokyo, Japan and Solamere Technology Group, Salt Lake city, USA). Emission light was captured with a 510 nm filter. Fluorescence images were acquired with a water-immersion, Nikon objective (20x, 0.5 NA), and a cooled digital CCD camera (Andor Technology iXon 897, Oxford Instruments, High Wycombe, UK) controlled by the iQ software (Andor iQ version 1.10.2). Fluorescence images were acquired at 10 ms exposure and 500 ms intervals. All intracellular Ca²⁺ imaging experiments were performed at room temperature (22–24°C). Image sequences were analyzed using Image J software (National Institutes of Health). The values obtained are expressed as Arbitrary Fluorescence Units (AFU). The area under each curve (AUC) was calculated using GraphPad PRISM 6.0 software (La Jolla, CA, USA). For those experiments performed in the absence of Ca²⁺, cells were superfused with Ca²⁺-free KRB; 0.25 mM EGTA or 100 μ M LaCl₃ were included in some experiments as stated in the figure legends. Cells were stimulated with thrombin or PARI, PAR3, or PAR4 APs for 1 minute.

2.6. Epifluorescence Microscopy. ARPE-19 cells were seeded onto 22 mm plates. Cells were serum-deprived for 24 hours and subsequently incubated for 30 min in the presence of BAPTA-AM (10 μ M) or the calpain inhibitors: calpastatin (1 μ M) or PD1506060 (100 μ M), followed by stimulation with either thrombin or PARI-AP in DMEM/F12 medium for 5 minutes at room temperature. Subsequently, cells were rinsed with PBS and incubated for 15 min at 37°C. Blocking was performed with 5% BSA for 30 minutes and incubated for 4 hrs with Santa Cruz Anti-PARI antibody (1:500). Following primary antibody incubation, cells were fixed for 10 min with 4% paraformaldehyde at 4°C. CY3 anti-mouse antibody was incubated for 1 hr (1:1000). Cells were washed 2x with PBS for 5 minutes. Nuclei were stained with Hoechst and further washed as before. Images were acquired with ACT-1 software in a Nikon microscope (Eclipse TE 2000-U) with DXM1200F camera and 40x objective (0.6 NA). Corrected Total Cell Fluorescence (CTCF) was calculated with ImageJ Software and normalized as percentage of control values.

2.7. Flow Cytometry. ARPE-19 cells were seeded onto 100 mm plates and serum-deprived for 24 hours. The cells were then detached using versene (5 mM Tris-HCl, 0.13 M NaCl, 0.5 M KCl, and 1.3 mM EDTA), and 5×10^5 cells were used for each experimental condition. Suspended cells were incubated for 30 minutes with 10 μ M BAPTA-AM or calpain inhibitors (1 μ M calpastatin or 100 μ M PD1506060); the inhibitors were present throughout the experiment. Cells were stimulated for 5 minutes at room temperature, either with thrombin or with PARI-AP in DMEM/F12 medium, rinsed with PBS, and blocked with 5% BSA-PBS. Cells were incubated with Anti-PARI-Alexa 488 antibody for 3 hours at 4°C, and fluorescence was measured with Attune Acoustic Focusing flow cytometer (Thermo Fisher Scientific, USA). Data were analyzed using FlowJo, LLC 10.2 software (FlowJo, USA).

2.8. Statistical Analysis. Raw data for analyses were obtained from at least three independent experiments, as specified in the figure legends. Multiple comparison ANOVA and Tukey's post hoc test was applied to all results for statistical analysis. Prism V6.0 from GraphPad (La Jolla, CA, USA) was used.

3. Results

3.1. Thrombin Induces $[Ca^{2+}]_i$ Increase. The effect of thrombin stimulation on RPE cell $[Ca^{2+}]_i$ was determined using fluorescence microscopy, as described in the Methods. Although thrombin-induced increase in $[Ca^{2+}]_i$ in RPE cells has been reported [32, 33], the characteristics of this response as a function of the intensity and duration of the stimulus, determinant for functional outcome, have not been analyzed.

Results in Figure 1(a) show that stimulation with thrombin induces a transient, dose-dependent $[Ca^{2+}]_i$ increase in RPE cells, sustained for ~3 min. $[Ca^{2+}]_i$ increase was found to be dose-dependent from 100 pM thrombin concentration with maximum stimulation attained at 10 nM thrombin treatment, equivalent to calcium elevation induced by FBS (positive control). The specificity of the effect was demonstrated

by inhibition upon the addition of the thrombin catalytic inhibitor PPACK (25 μ M) (Figures 1(a) and 1(b)). Calculation of the area under the curves (AUC) in (Figure 1(a)) from the stimulation time-point to the 4th minute is plotted as a function of fluorescence intensity (Arbitrary Fluorescence Units (AFU)) over time (Figure 1(b)). The Ec_{50} for thrombin effect was calculated from the logarithmic curve in (Figure 1(b)) and found to be $Ec_{50} = 0.55$ nM (Figure 1(c)).

3.2. Thrombin-Induced Increase in $[Ca^{2+}]_i$ Is Mediated by PARI. In order to identify the specific receptor mediating thrombin effect, we tested the effect of PAR-APs on $[Ca^{2+}]_i$ using fluorescence microscopy as described in Methods. $[Ca^{2+}]_i$ was plotted as a function of fluorescence intensity (AFU) over time (minutes). Results in Figure 2(a) show that only PARI-AP (2.5 μ M) induced an increase in $[Ca^{2+}]_i$ comparable to that elicited by 10 nM thrombin. Figure 2(b) shows the calculated area under the curves (AUC) shown in Figure 2(a). These results demonstrate that PARI is responsible for $[Ca^{2+}]_i$ increase induced by thrombin.

3.3. Calcium Release from Intracellular Pools Is the Main Source of Thrombin-Induced $[Ca^{2+}]_i$ Increase. In order to determine the contribution of external and internal calcium pools to thrombin- and PARI-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase, thrombin stimulation was carried in Ca^{2+} free medium containing 0.25 mM EGTA. As shown in Figure 3, thrombin and PARI-AP responses were decreased by ~20% in this condition, indicating a minor contribution of extracellular calcium to thrombin-induced $[Ca^{2+}]_i$ rise. In contrast, thrombin- and PARI AP-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase was inhibited by ~80% upon the inclusion of 2 μ M thapsigargin, known to deplete ER calcium stores (Figures 3(a) and 3(b)). These results were confirmed by the complete inhibition of thrombin effect by the joint inclusion of EGTA and thapsigargin. On this line, the store-operated calcium entry (SOCE) channels Orai and TRPC are activated by the depletion of intracellular Ca^{2+} stores. Since thrombin induces Gq/PLC β signaling, which is a physiological stimulus for store depletion, we tested the effect of the membrane Ca^{2+} channel inhibitor LaCl₃, on PARI-mediated $[Ca^{2+}]_i$ increase. Figure 3(c) shows that LaCl₃ had a similar effect to that of EGTA, suggesting the possible participation of SOCE in PARI-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase. Collectively, these data indicate that Ca^{2+} release from intracellular Ca^{2+} stores is the main source of $[Ca^{2+}]_i$ increase induced by thrombin.

3.4. Thrombin Promotes Calpain Activity through PARI Activation. The effect of thrombin stimulation on calpain activity was assessed by the degradation of the synthetic calpain substrate peptide Suc-LLVY using Calpain-Glo Protease Assay, designed for measuring the activation of calpain isoforms μ and m [34]. Our results show that thrombin stimulation increases calpain activity by ~250% over control level. Activation appeared to be thrombin-specific, since it was prevented by the catalytic thrombin inhibitor PPACK (Figure 4(a)). In order to identify PARI as the mediator of

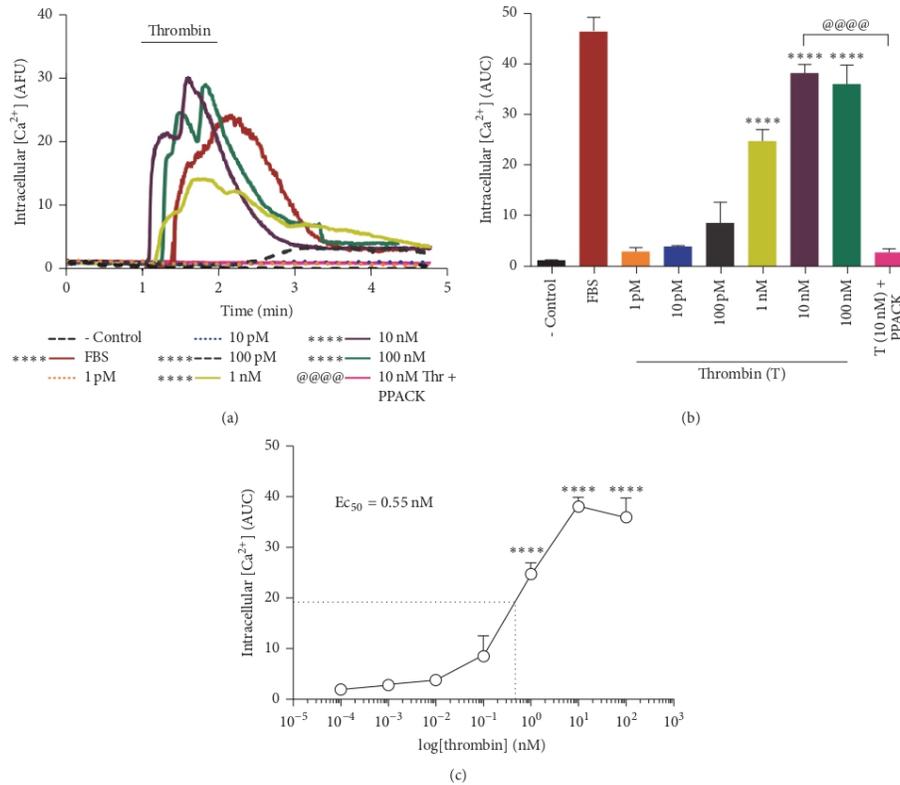


FIGURE 1: Thrombin induces a specific, dose-dependent increase in $[Ca^{2+}]_i$. Cells were serum-deprived for 24 hours prior to stimulation with increasing concentrations of thrombin. $[Ca^{2+}]_i$ was monitored by fluorescence microscopy as described in the Methods. (a) Thrombin induces a transient, saturable $[Ca^{2+}]_i$ increase, sustained for ~3 min. $[Ca^{2+}]_i$ was plotted as a function of fluorescence intensity (Arbitrary Fluorescence Units (AFU)) over time (minutes). Specificity of thrombin effect was assessed by inclusion of the thrombin inhibitor PPACK (25 μM). 10% FBS was included as positive control. (b) The area under the curves (AUC) plotted in (a) was calculated from the stimulation point up to the 4th minute of stimulation. (c) Thrombin EC_{50} = 0.55 nM was calculated from the logarithmic transformation of data in (b). Results are expressed as the mean \pm SEM of three independent experiments compared to nonstimulated cells (- Control). Multiple comparison ANOVA and Tukey's test: α = 0.001 (****) referred to negative control or α = 0.001 (@@@@) referred to thrombin stimulation.

thrombin effect, we tested the effect of PARI-AP on calpain activity. Results showed that PARI-AP stimulated calpain activity by ~170% (Figure 4(a)).

To establish if calpain activation by thrombin depends on thrombin-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase, cells were loaded with the selective cell-permeant Ca^{2+} chelator BAPTA-AM prior to thrombin stimulation. Results in Figure 4(b) show that inclusion of BAPTA-AM (10 μM) completely prevented thrombin-induced calpain activation. Calpain activity was abolished by the calpain endogenous inhibitor calpastatin (1 μM) and by the synthetic inhibitor PD150606 (100 μM),

thus confirming the specificity of the effect (Figure 4(b)). These data demonstrate that thrombin-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase promotes calpain activation through the activation of PARI.

3.5. Activation of Calpain by Thrombin Stimulation Promotes α -Spectrin Proteolysis. Spectrin, an extended rod-shaped tetramer composed of two α and two β subunits, forms a cytoskeletal meshwork with actin and other accessory proteins lining the cytoplasmic surface of most cell membranes, thus providing a mechanism for restricting the free diffusion

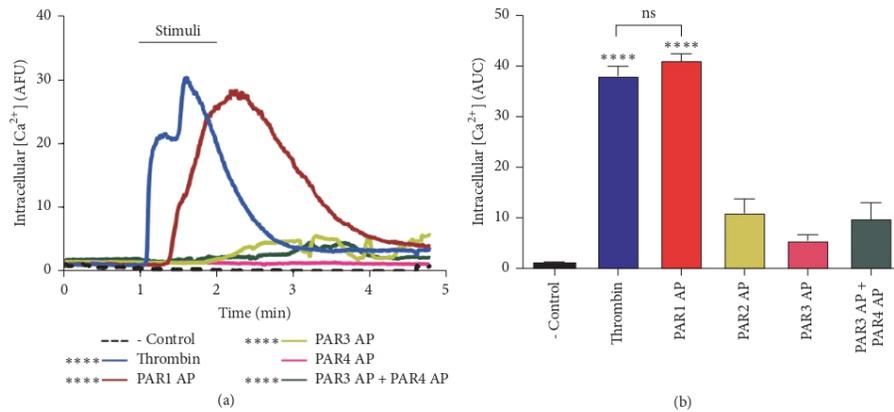


FIGURE 2: Thrombin-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase is mimicked by PARI-AP. Cells were serum-deprived for 24 hours prior to stimulation with thrombin or PAR-APs. $[Ca^{2+}]_i$ was assessed by fluorescence microscopy as described in Methods. (a) PARI-AP ($2.5 \mu M$) induced an increase in $[Ca^{2+}]_i$, comparable to thrombin. $[Ca^{2+}]_i$ was plotted as a function of fluorescence intensity (Arbitrary Fluorescence Units (AFU)) over time (minutes). (b) The graph represents the area under the curves in (a). Thrombin (10 nM) stimulation was used as positive control. Results are expressed as the mean \pm SEM of three independent experiments, compared to nonstimulated cells (- Control). Multiple comparison ANOVA and Tukey's test: $\alpha = 0.001$ (****) referred to negative control.

of transmembrane proteins [35]. Limited proteolysis of α -spectrin by μ -calpain [36] prevents spectrin interaction with actin [37] and also spectrin association with membrane-binding sites [38] allowing protein endocytosis [28]. Based on this evidence, we tested the effect of thrombin stimulation on α -spectrin proteolysis.

As shown in Figure 5(a), thrombin stimulation induced the proteolysis of α -spectrin 250 kDa subunit into ~ 150 kDa and ~ 120 kDa fragments. This effect appeared to be thrombin-specific, prevented by PPACK (Figure 5(a)). Thrombin-induced α -spectrin proteolysis was mimicked by PARI-AP (Figure 5(b)). The specificity of α -spectrin degradation by calpain was confirmed by the blockage of the effect by the calpain inhibitors calpastatin and PD150606 and by the calcium chelator BAPTA-AM (Figure 5(c)). These results indicate that thrombin-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase activates calpain-mediated proteolysis of α -spectrin through the activation of PARI.

3.6. Thrombin Decreases PARI Membrane Expression through PARI-Induced Calpain Activation. The effect of thrombin-induced calpain activation on PARI plasma membrane expression was investigated using epifluorescence microscopy (Figure 6) and flow cytometry (Figure 7). Epifluorescence analysis in Figure 6(b) shows that stimulation with 10 nM thrombin for 5 min significantly decreased PARI expression at the plasma membrane; this effect was prevented by the thrombin inhibitor PPACK. To determine if thrombin

effect on PARI membrane expression is mediated by the activation of PARI, we analyzed the effect of PARI-AP on PARI membrane expression. Time-course analysis of PARI-AP effect showed that although stimulation by $25 \mu M$ PARI-AP for 5 min did not modify PARI membrane expression, sustained stimulation with the agonist for 60 min decreased PARI expression at the membrane to the same extent as 5 min application of thrombin (Figure 6(c)). Epifluorescence analysis showed that thrombin stimulation decreased PARI membrane expression by 89%. This effect was significantly prevented by calcium removal (BAPTA-AM plus EGTA) or by the inhibition of calpain by the inclusion of calpastatin or PD150606 (Figure 6(d)). In order to discard a nonspecific effect of fixation in epifluorescence analysis, PARI membrane expression was assessed in living cells using flow cytometry. Results from epifluorescence analysis were precisely confirmed by flow cytometry experiments. Figure 7 shows that stimulation by thrombin (Figure 7(b)) or by PARI-AP (Figure 7(c)) decreases PARI membrane expression by 89%. This effect was partially prevented by inclusion of EGTA and BAPTA-AM or the inhibition of calpain by calpastatin or PD150606 (Figure 7(d)). The specificity of thrombin effect was confirmed by PPACK inhibition (Figure 7(b)). These results demonstrate that thrombin induces the Ca^{2+} and calpain-dependent decrease in PARI membrane expression and suggest the participation of distinct thrombin-activated processes in the regulation of PARI membrane expression.

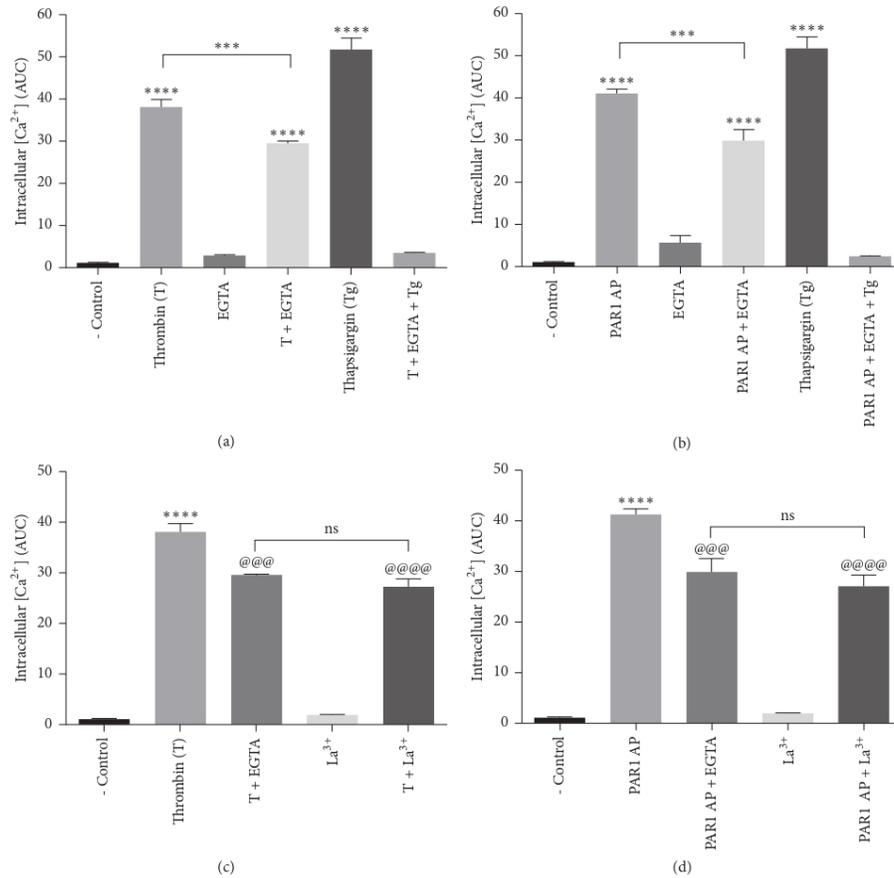


FIGURE 3: Thrombin promotes $[Ca^{2+}]_i$ increase mainly by the release from intracellular pools. Serum-deprived cells were stimulated with thrombin or PARI-AP. $[Ca^{2+}]_i$ was determined by fluorescence microscopy as described in Methods. (a) Thrombin-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase is partially prevented by EGTA (0.25 mM) and abolished by thapsigargin (Tg; 2 μ M) + EGTA. (b) Thrombin-induced calcium release is mimicked by PARI-AP. (c) Blockage of plasma membrane calcium channels by Lanthanum (La^{3+} ; 100 μ M) decreases thrombin-induced and (d) PARI-AP-induced calcium increase to a similar extent as EGTA. Results are expressed as the area under the curve (AUC) compared to nonstimulated (NS) cells (negative control). Data are the mean \pm SEM of three independent experiments. Multiple comparison ANOVA and Tukey's test: $\alpha = 0.001$ (****) or $\alpha = 0.01$ (***) referred to negative control. And $\alpha = 0.001$ (@@@) or $\alpha = 0.01$ (@@@) referred to thrombin stimulation (10 nM) or PARI1 peptide agonist (2.5 μ M).

4. Discussion

The internalization and membrane recycling of native PARs is required for cell resensitization to thrombin, whereas the internalization and lysosomal degradation of activated PARs are important for the termination of G protein signaling [11, 12]. However, the mechanisms that control PARI1 inactivation

are still not clear. Thrombin has been shown to activate PARI1 in RPE cells, which promotes the epithelial-mesenchymal transformation, proliferation, and migration of RPE cells, processes involved in the development of proliferative eye diseases leading to blindness [3]. Using human-derived ARPE-19 cells as a model for RPE, in the present study we investigated the mechanism responsible for the termination

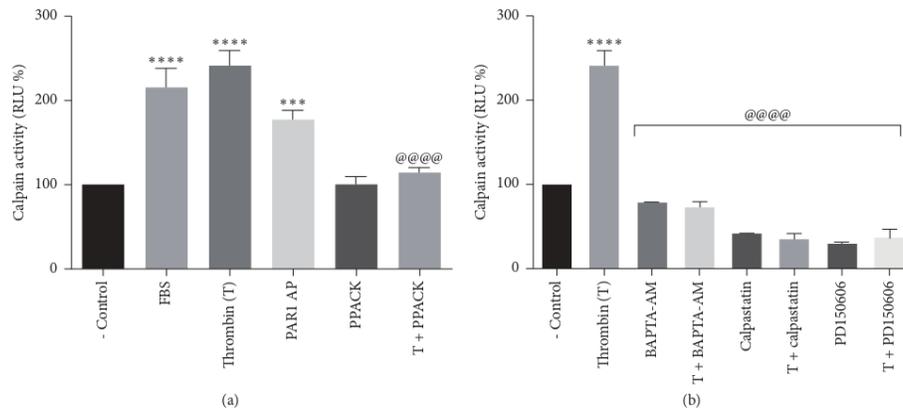


FIGURE 4: Thrombin activation of PAR1 stimulates the calcium-dependent activation of calpain. ARPE-19 cells were serum-deprived for 24 hours prior to stimulation for 1 min with 10 nM thrombin or 2.5 μ M PAR1-AP. PPACK, BAPTA-AM, and calpain inhibitors were included 30 minutes prior to stimulation. Calpain activation was measured as a function of luciferase activity as described in Methods. (a) Thrombin stimulates calpain activity by ~250% in a specific manner, prevented by PPACK. 10% FBS was included as positive control. PAR1-AP stimulates calpain activity by ~170% compared to negative control (- Control). (b) Calpain activation was prevented by the inclusion of BAPTA-AM (10 μ M), calpastatin (1 μ M), and PD150606 (100 μ M). Results in Relative Luminescence Units (RLU) are the mean \pm SEM of three independent experiments. Values for nonstimulated cultures maintained in serum-free DMEM/F12 (- Control) were set as 100%. Multiple comparison ANOVA and Tukey's test: $\alpha = 0.001$ (****) or $\alpha = 0.01$ (****) referred to negative control; $\alpha = 0.001$ (@@@@) referred to thrombin stimulation.

of thrombin-induced PAR1 signaling and demonstrated that activation of PAR1 by thrombin decreases PAR1 membrane expression through the Ca^{2+} -dependent activation of calpain. Our results suggest a novel regulatory mechanism by which activation of PAR1 controls its own availability at the plasma membrane.

We demonstrated that thrombin induces calpain activation through a specific process prevented by PPACK and identified to PAR1 as the receptor responsible for this effect (Figure 4(a)). As expected, thrombin-induced calpain activation required $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and was prevented by the specific calpain inhibitors calpastatin and PD150606 (Figure 4(b)). In order to establish a role for calpain in PAR1 membrane decrease, we examined thrombin effect on the cleavage of the endogenous μ -calpain substrate α -spectrin, required for clathrin-mediated endocytosis [39, 40]. Thrombin and PAR1-AP were shown to increase α -spectrin degradation (Figures 5(a) and 5(b)), indicating that PAR1 is responsible for thrombin-induced activation of μ -calpain and the subsequent degradation of α -spectrin (Figure 5(c)).

Thrombin-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mobilization in RPE cells has been reported [32, 33]. Since calpain is a Ca^{2+} activated protease, we showed that thrombin induces the specific, dose-dependent increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ with an EC_{50} of 0.55 nM (Figure 1(c)). In agreement with previous findings [8], $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevation was mildly decreased in Ca^{2+} -free medium (20%) and significantly inhibited by thapsigargin (80%; Figure 3),

indicating that the main source of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ rise is Ca^{2+} release from internal stores, although Ca^{2+} influx is involved to a minor extent. Interestingly, La^{3+} inhibition of thrombin- and PAR1-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase to the same extent as EGTA (20%) suggests that Ca^{2+} entry through Orai-containing or voltage-gated Ca^{2+} channels could account for thrombin-induced extracellular Ca^{2+} entry (Figure 3) [41–43]. We identified PAR1 as the main receptor responsible for thrombin-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase, since PAR1-AP elicited $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase equivalent to that induced by thrombin (Figure 2), whereas stimulation by PAR3-AP or PAR4-AP did not. These results are in agreement with findings in epithelial cells [44, 45], although in contrast with a previous report showing the increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induced by PAR4 stimulation in ARPE-19 cells [33]. This discrepancy could be ascribed to the use by Narayan et al. (2010) of a synthetic PAR4-AP 10 times more potent than the endogenous agonist peptide used in the present work [46].

The main objective of this work was to investigate the effect of thrombin on PAR1 membrane expression and the role of calpain in the control of this process. Our results showed that the activation of PAR1 by thrombin induces a significant decrease in PAR1 membrane expression in RPE cells, via the Ca^{2+} -dependent activation of μ -calpain and the subsequent proteolysis of α -spectrin by this enzyme. Since calpains are involved in the formation of coated vesicles and α -spectrin degradation is essential for the endocytic

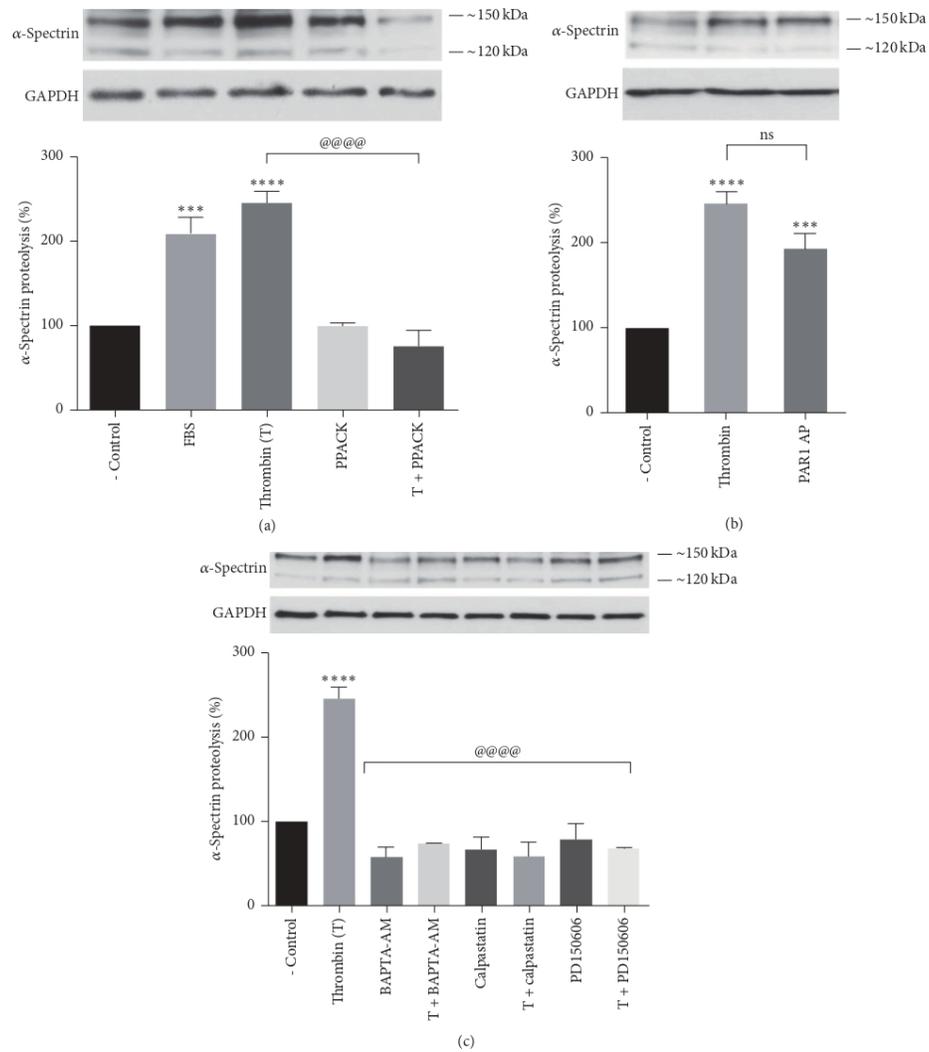


FIGURE 5: Thrombin induces α -spectrin degradation through PARI-mediated Ca^{2+} -dependent activation of calpain. Serum-deprived ARPE-19 cells were stimulated for 1 minute with 10 nM thrombin or 2.5 μ M PARI-AP. PPACK, calcium chelators, and calpain inhibitors were included 30 minutes ahead of stimulation. α -Spectrin proteolysis into 150 kDa and 120 kDa fragments was assessed by Western blot. (a) Thrombin stimulates α -spectrin proteolysis by ~250% in a specific manner prevented by PPACK (25 μ M). 10% FBS was included as positive control. (b) Thrombin effect was mimicked by 2.5 μ M PARI-AP. (c) Chelation of intracellular Ca^{2+} (10 μ M BAPTA-AM), calpastatin (1 μ M), and PDI150606 (100 μ M) prevented calpain activation. Results are expressed as percentage of α -spectrin proteolysis compared to nonstimulated cells (- Control). Data are the mean \pm SEM of three independent experiments. Multiple comparison ANOVA and Tukey's test: $\alpha = 0.001$ (****) or $\alpha = 0.01$ (***) referred to negative control. Or $\alpha = 0.001$ (@@@@) referred to thrombin stimulation.

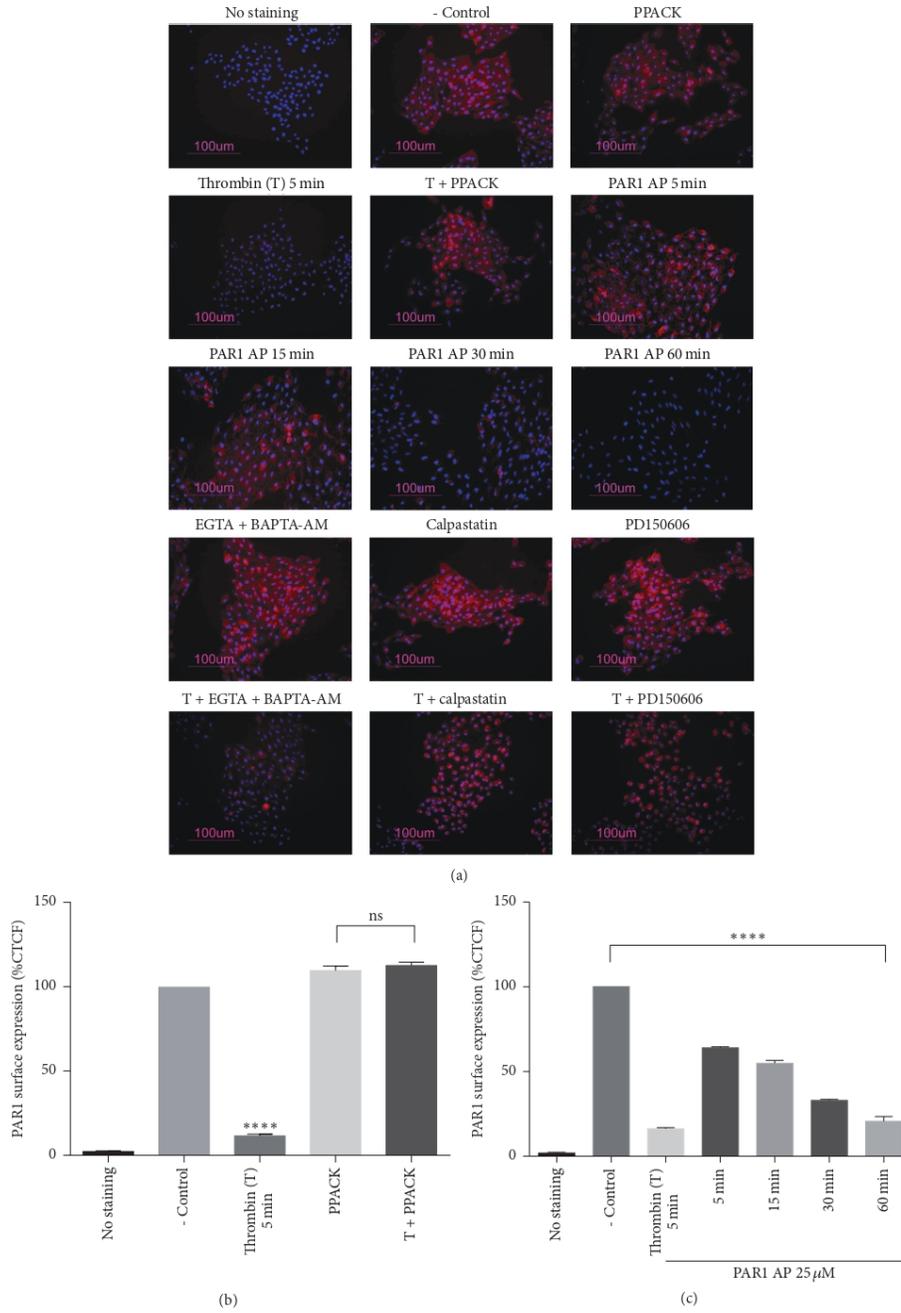


FIGURE 6: Continued.

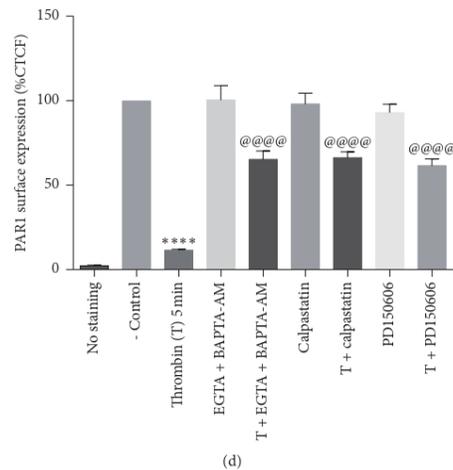


FIGURE 6: Thrombin stimulation decreases PAR1 membrane expression through calpain activation. Cells were serum-deprived for 24 hours prior to stimulation with thrombin or PAR1-AP. PAR1 membrane expression was assessed by epifluorescence microscopy. (a) PAR1 (CY3; red) and cell nuclei (Hoechst; blue) merged images. (b) Quantitative analysis of epifluorescence images shown in (a). Thrombin (10 nM) decreases PAR1 membrane expression through a specific process prevented by PPACK (25 μ M). (c) Stimulation with PAR1-AP (25 μ M) for 60 min decreases PAR1 membrane expression to the same extent as thrombin stimulation for 5 min. (d) Thrombin-induced decrease in PAR1 membrane expression requires calcium-dependent activation of calpain. Thrombin-induced decrease in PAR1 membrane expression is prevented by the joint addition of BAPTA-AM (10 μ M) and EGTA (0.25 mM), by calpastatin (1 μ M) and by PD150606 (100 μ M). Results are expressed as the Corrected Total Cell Fluorescence (CTCF) compared to nonstimulated cells (- Control). Data are the mean \pm SEM of three independent experiments. Multiple comparison ANOVA and Tukey's test: $\alpha = 0.001$ (****) referred to negative control. Or $\alpha = 0.001$ (@@@@) referred to thrombin stimulation.

process, our data indicate that PAR1 signals to promote the internalization of PAR1 carried by clathrin-coated pits [47]. Nevertheless, epifluorescence and flow cytometry analysis in Figures 6(d) and 7(d) clearly showed that calcium withdrawal or calpain inhibition only partially prevents thrombin-induced reduction in PAR1 membrane expression, suggesting that calcium-dependent calpain activation is not the only mechanism involved in thrombin-induced decrease in PAR1 membrane expression. Among the $[Ca^{2+}]_i$ - and calpain-independent mechanisms shown to regulate PAR1 membrane expression, the N-linked glycosylation of PAR-1 second extracellular loop is known to regulate the internalization of this receptor [48]. Also on this line, Bicaudal D1 (BicD1) has been identified from a screen of an embryonic cDNA library as an adapter molecule directly interacting with the C-terminal cytoplasmic domain of PAR1, involved in the transport of PAR1 from the plasma membrane to endosomal vesicles. In fact, silencing of BicD1 expression impairs endocytosis of PAR1 [49]. However, the possible effect of thrombin on the activation/regulation of these processes remains to be explored.

We here identified a novel mechanism through which thrombin activation of PAR1 autoregulates its membrane expression through the increase in $[Ca^{2+}]_i$, the activation

of calpain by calcium, and the degradation of α -spectrin by calpain. Together with the present results, the future definition of additional thrombin-activated pathways involved in the regulation of PAR1 membrane expression may provide information aimed at preventing thrombin-mediated RPE cell transformation involved in proliferative retinopathies.

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Acknowledgments

This work was partially supported by CONACyT (Grant 254333) and by PAPIIT/UNAM (Grant IN205317) to Ana María López-Colomé. Alejandro Alvarez-Arce is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), and received fellowship 573317 from CONACyT. Authors acknowledge Nicolás Jiménez-Pérez for technical assistance in Ca^{2+} imaging experiments and Dr. Laura Ongay for technical support in flow cytometry experiments.

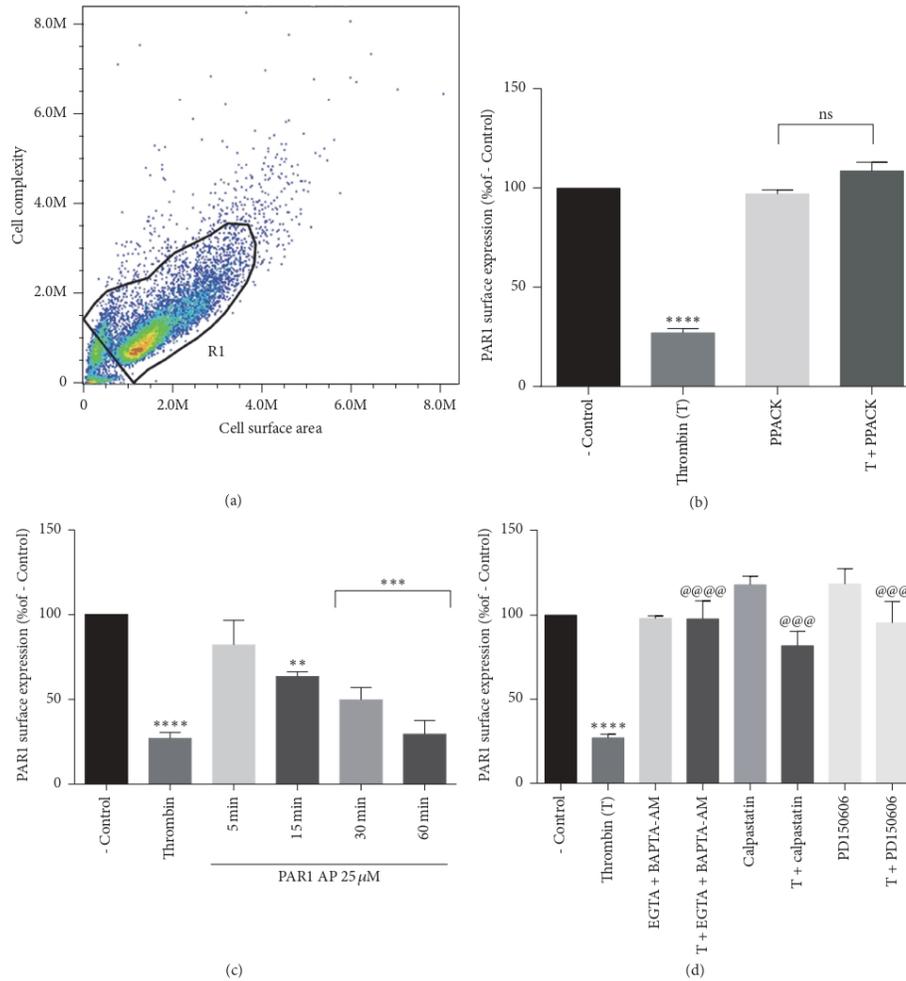
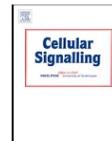


FIGURE 7: Stimulation of living cells by thrombin decreases PAR1 membrane expression through a Ca^{2+} - and calpain-dependent process. Cells were serum-deprived for 24 hours prior to stimulation with thrombin or PARI-AP. The decrease in thrombin-induced PAR1 membrane expression measured in fixed preparations (Figure 6) was confirmed in living cells by flow cytometry. (a) Cell population selected for analysis. (b) Thrombin (10 nM) stimulation decreases PAR1 membrane expression by a specific process prevented by PPACK (25 μ M). (c) PARI-AP (25 μ M) induces time-dependent decrease in PAR1 membrane expression. (d) Thrombin induces the decrease in PAR1 membrane expression through the calcium-dependent activation of calpain. This effect was prevented by the joint addition of BAPTA-AM (10 μ M) and EGTA (0.25 mM), calpastatin (1 μ M), or PD150606 (100 μ M). Results are expressed as a percent of fluorescence in nonstimulated cells (- Control). Data are the mean \pm SEM of three independent experiments. Multiple comparison ANOVA and Tukey's test: $\alpha = 0.001$ (****), $\alpha = 0.01$ (**), or $\alpha = 0.1$ (*) referred to negative control. And $\alpha = 0.001$ (@@@) or $\alpha = 0.01$ (@@) referred to thrombin stimulation.

References

- [1] O. Strauss, "The retinal pigment epithelium in visual function," *Physiological Reviews*, vol. 85, no. 3, pp. 845–881, 2005.
- [2] J. Bastiaans, J. C. van Meurs, V. C. Mulder et al., "The Role of Thrombin in Proliferative Vitreoretinopathy," *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 55, no. 7, pp. 4659–4666, 2014.
- [3] H. Nagasaki, K. Shinagawa, and M. Mochizuki, "Risk factors for proliferative vitreoretinopathy," *Progress in Retinal and Eye Research*, vol. 17, no. 1, pp. 77–98, 1998.
- [4] K. Mihara, R. Ramachandran, M. Saifeddine et al., "Thrombin-mediated direct activation of proteinase-activated Receptor-2: Another target for thrombin signaling," *Molecular Pharmacology*, vol. 89, no. 5, pp. 606–614, 2016.
- [5] V. S. Ossovskaya and N. W. Bunnett, "Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease," *Physiological Reviews*, vol. 84, no. 2, pp. 579–621, 2004.
- [6] T.-K. H. Vu, D. T. Hung, V. I. Wheaton, and S. R. Coughlin, "Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation," *Cell*, vol. 64, no. 6, pp. 1057–1068, 1991.
- [7] T.-K. H. Vu, V. I. Wheaton, D. T. Hung, I. Charo, and S. R. Coughlin, "Domains specifying thrombin-receptor interaction," *Nature*, vol. 353, no. 6345, pp. 674–677, 1991.
- [8] J. Chun, T. Hla, S. Spiegel, and W. Moolenaar, "Inhibition of thrombin receptor signaling by a G-protein coupled receptor kinase. Functional specificity among G-protein coupled receptor kinases," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 269, no. 2, pp. 1125–1130, 1994.
- [9] C. Tirupathi, W. Yan, R. Sandoval et al., "G protein-coupled receptor kinase-5 regulates thrombin-activated signaling in endothelial cells," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 97, no. 13, pp. 7440–7445, 2000.
- [10] M. J. Lohse, J. L. Benovic, J. Codina, M. G. Caron, and R. J. Lefkowitz, " β -arrestin: A protein that regulates β -adrenergic receptor function," *Science*, vol. 248, no. 4962, pp. 1547–1550, 1990.
- [11] M. A. Booden, L. B. Eckert, C. J. Der, and J. Trejo, "Persistent Signaling by Dysregulated Thrombin Receptor Trafficking Promotes Breast Carcinoma Cell Invasion," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 24, no. 5, pp. 1990–1999, 2004.
- [12] J. Trejo, S. R. Hammes, and S. R. Coughlin, "Termination of signaling by protease-activated receptor-1 is linked to lysosomal sorting," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 95, no. 23, pp. 13698–13702, 1998.
- [13] M. M. Paing, C. A. Johnston, D. P. Siderovski, and J. Trejo, "Clathrin adaptor AP2 regulates thrombin receptor constitutive internalization and endothelial cell resensitization," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 26, no. 8, pp. 3231–3242, 2006.
- [14] M. M. Paing, A. B. Stutts, T. A. Kohout, R. J. Lefkowitz, and J. Trejo, " β -arrestins regulate protease-activated receptor-1 desensitization but not internalization or down-regulation," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 2, pp. 1292–1300, 2002.
- [15] U. J. Soh, M. R. Dores, B. Chen, and J. Trejo, "Signal transduction by protease-activated receptors," *British Journal of Pharmacology*, vol. 160, no. 2, pp. 191–203, 2010.
- [16] B. Chen, D. P. Siderovski, R. R. Neubig, M. A. Lawson, and J. Trejo, "Regulation of protease-activated receptor 1 signaling by the adaptor protein complex 2 and R4 subfamily of regulator of G protein signaling proteins," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 289, no. 3, pp. 1580–1591, 2014.
- [17] B. Chen, M. R. Dores, N. Grimsey, I. Canto, B. L. Barker, and J. Trejo, "Adaptor Protein complex-2 (AP-2) and epsin-1 mediate protease-activated receptor-1 internalization via phosphorylation- and ubiquitination-dependent sorting signals," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 286, no. 47, pp. 40760–40770, 2011.
- [18] D. E. Goll, V. F. Thompson, H. Q. Li, W. Wei, and J. Y. Cong, "The calpain system," *Physiological Reviews*, vol. 83, no. 3, pp. 731–801, 2003.
- [19] S. Ohno, Y. Emori, S. Imajoh, H. Kawasaki, M. Kisaragi, and K. Suzuki, "Evolutionary origin of a calcium-dependent protease by fusion of genes for a thiol protease and a calcium-binding protein?" *Nature*, vol. 312, no. 5994, pp. 566–570, 1984.
- [20] Y. Huang and K. K. W. Wang, "The calpain family and human disease," *Trends in Molecular Medicine*, vol. 7, no. 8, pp. 355–362, 2001.
- [21] J. D. Glass, D. G. Culver, A. I. Levey, and N. R. Nash, "Very early activation of m-calpain in peripheral nerve during Wallerian degeneration," *Journal of the Neurological Sciences*, vol. 196, no. 1–2, pp. 9–20, 2002.
- [22] U.-J. P. Zimmerman, L. Boring, U. H. Pak, N. Mukerjee, and K. K. W. Wang, "The calpain small subunit gene is essential: Its inactivation results in embryonic lethality," *IUBMB Life*, vol. 50, no. 1, pp. 63–68, 2000.
- [23] A. Khorchid and M. Ikura, "How calpain is activated by calcium," *Nature Structural & Molecular Biology*, vol. 9, no. 4, pp. 239–241, 2002.
- [24] K. Sato, Y. Saito, and S. Kawashima, "Identification and Characterization of Membrane-Bound Calpains in Clathrin-Coated Vesicles from Bovine Brain," *European Journal of Biochemistry*, vol. 230, no. 1, pp. 25–31, 1995.
- [25] Y. Maemoto, Y. Ono, S. Kiso et al., "Involvement of calpain-7 in epidermal growth factor receptor degradation via the endosomal sorting pathway," *FEBS Journal*, vol. 281, no. 16, pp. 3642–3655, 2014.
- [26] N. Rudinskiy, Y. Grishchuk, A. Vaslin et al., "Calpain hydrolysis of α - and β 2-adaptins decreases clathrin-dependent endocytosis and may promote neurodegeneration," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 284, no. 18, pp. 12447–12458, 2009.
- [27] M. Aversa, R. Stifanese, R. Grosso et al., "Role of calpain in the regulation of CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) turnover," *Biochemical Journal*, vol. 430, no. 2, pp. 255–263, 2010.
- [28] A. Kamal, Y.-S. Ying, and R. G. W. Anderson, "Annexin VI-mediated loss of spectrin during coated pit budding is coupled to delivery of LDL to lysosomes," *The Journal of Cell Biology*, vol. 142, no. 4, pp. 937–947, 1998.
- [29] A. Czogalla and A. F. Sikorski, "Spectrin and calpain: A 'target' and a 'sniper' in the pathology of neuronal cells," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 62, no. 17, pp. 1913–1924, 2005.
- [30] K. Seyb, J. Ni, M. Huang, E. Schuman, M. L. Michaelis, and M. A. Glicksman, "Screen for calpain inhibitors using a cell-based, high-throughput assay calpain assay," *Cell Notes*, vol. 18, pp. 6–8, 2007.
- [31] A. Hernández-Cruz, A. L. Escobar, and N. Jiménez, "Ca²⁺-induced Ca²⁺ release phenomena in mammalian sympathetic neurons are critically dependent on the rate of rise of trigger Ca²⁺," *The Journal of General Physiology*, vol. 109, no. 2, pp. 147–167, 1997.

- [32] R.-M. Catalioto, C. Valenti, C. A. Maggi, and S. Giuliani, "Enhanced Ca^{2+} response and stimulation of prostaglandin release by the bradykinin B2 receptor in human retinal pigment epithelial cells primed with proinflammatory cytokines," *Biochemical Pharmacology*, vol. 97, no. 2, pp. 189–202, 2015.
- [33] S. Narayan, G. Prasanna, K. Tchedre, R. Krishnamoorthy, and T. Yorio, "Thrombin-induced endothelin-1 synthesis and secretion in retinal pigment epithelial cells is Rho kinase dependent," *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, vol. 26, no. 5, pp. 389–397, 2010.
- [34] M. O'Brien, M. Scurria, K. Rashka, B. Daily, and T. Riss, "A bioluminescent assay for calpain activity," *Promega Notes*, vol. 91, pp. 6–9, 2005.
- [35] V. Bennett, "Spectrin-based membrane skeleton: A multipotential adaptor between plasma membrane and cytoplasm," *Physiological Reviews*, vol. 70, no. 4, pp. 1029–1065, 1990.
- [36] L. Löfvenberg and L. Backman, "Calpain-induced proteolysis of β -spectrins," *FEBS Letters*, vol. 443, no. 2, pp. 89–92, 1999.
- [37] P. S. Becker, M. A. Schwartz, J. S. Morrow, and S. E. Lux, "Radiolabel-transfer cross-linking demonstrates that protein 4.1 binds to the N-terminal region of β spectrin and to actin in binary interactions," *European Journal of Biochemistry*, vol. 193, no. 3, pp. 827–836, 1990.
- [38] R.-J. Hu and V. Bennett, "In vitro proteolysis of brain spectrin by calpain I inhibits association of spectrin with ankyrin-independent membrane binding site(s)," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 266, no. 27, pp. 18200–18205, 1991.
- [39] M. W. Lambert, "Functional Significance of Nuclear α Spectrin," *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 116, no. 9, pp. 1816–1830, 2015.
- [40] P. Zhang, D. Sridharan, and M. W. Lambert, "Knockdown of μ -calpain in fanconi anemia, FA-A, cells by siRNA restores α I spectrin levels and corrects chromosomal instability and defective DNA interstrand cross-link repair," *Biochemistry*, vol. 49, no. 26, pp. 5570–5581, 2010.
- [41] S. Cordeiro and O. Strauss, "Expression of Orai genes and ICRAC activation in the human retinal pigment epithelium," *Graefes' Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, vol. 249, no. 1, pp. 47–54, 2011.
- [42] S. Wimmers, L. Coeppicus, R. Rosenthal, and O. Strauß, "Expression profile of voltage-dependent Ca^{2+} channel subunits in the human retinal pigment epithelium," *Graefes' Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, vol. 246, no. 5, pp. 685–692, 2008.
- [43] I.-H. Yang, Y.-T. Tsai, S.-J. Chiu et al., "Involvement of STIM1 and Orail in EGF-mediated cell growth in retinal pigment epithelial cells," *Journal of Biomedical Science*, vol. 20, no. 1, article 41, 2013.
- [44] E. Ostrowska and G. Reiser, "The protease-activated receptor-3 (PAR-3) can signal autonomously to induce interleukin-8 release," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 65, no. 6, pp. 970–981, 2008.
- [45] L. Seminario-Vidal, S. Kreda, L. Jones et al., "Thrombin promotes release of ATP from lung epithelial cells through coordinated activation of Rho- and Ca^{2+} -dependent signaling pathways," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 284, no. 31, pp. 20638–20648, 2009.
- [46] T. R. Faruqi, E. J. Weiss, M. J. Shapiro, W. Huang, and S. R. Coughlin, "Structure-function analysis of protease-activated receptor 4 tethered Ligand peptides. Determinants of specificity and utility in assays of receptor function," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, no. 26, pp. 19728–19734, 2000.
- [47] K. Sato, S. Hattori, S. Irie, H. Sorimachi, M. Inomata, and S. Kawashima, "Degradation of fodrin by m-calpain in fibroblasts adhering to fibrillar collagen I gel," *The Journal of Biochemistry*, vol. 136, no. 6, pp. 777–785, 2004.
- [48] A. G. Soto and J. Trejo, "N-linked glycosylation of protease-activated receptor-1 second extracellular loop: A critical determinant for ligand-induced receptor activation and internalization," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 285, no. 24, pp. 18781–18793, 2010.
- [49] S. Swift, J. Xu, V. Trivedi et al., "A novel protease-activated receptor-1 interactor, bicaudal D1, regulates G protein signaling and internalization," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 285, no. 15, pp. 11402–11410, 2010.



Thrombin-activated PAR1 membrane expression is regulated by Rab11a-RCP complex dissociation



Alejandro Alvarez-Arce, Irene Lee-Rivera, Edith López, Ana María López-Colomé*

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

ARTICLE INFO

Keywords:
Retina
Proliferative disease
Trafficking
Thrombin
Calpain
GPCR internalization

ABSTRACT

PAR1 activation by thrombin promotes intracellular signaling leading to RPE cell transformation, proliferation, and migration, characteristic of fibroproliferative eye diseases. Due to the cleavage of PAR1 N-terminal domain, carried by thrombin, the arrest of PAR1 signaling is achieved by transport into lysosomes and degradation. Recent findings suggest that the GTPase Rab11a in conjunction with its effector RCP may direct PAR1 to lysosomes. Hereby we demonstrate that thrombin-induced PAR1 internalization and lysosomal targeting requires the disassembly of the Rab11a/RCP complex, and that this process depends on thrombin-induced intracellular calcium increase and calpain activation. These findings unveil a novel mechanism that regulates thrombin activated PAR1 internalization and degradation.

1. Introduction

The serine protease thrombin is better known by its essential role in the coagulation cascade. However, it also triggers a variety of responses not only in blood cells such as platelets, but also in endothelial cells, and other tissues. It achieves such function through the activation of Protease-Activated Receptors (PARs), a family of G-protein-coupled-receptors (GPCRs) composed by PAR1, PAR2, PAR3 and PAR4 [1]. The four receptors of this family are activated by the cleavage of the extracellular N-terminal domain, which unmasks a new N-terminal sequence that functions as an intra-molecular ligand [2]. PAR1, the prototype of this receptor family is activated by the proteolytic cleavage at the Arg41-Ser42 by thrombin which exposes a new N-terminal (42-SFLLRN-47) that acts as a tethered ligand.

PARs play a very important role in hemostasis, thrombosis and inflammatory responses to tissue injury by regulating cellular responses such as cytokine secretion, integrin activation, metabolic regulation, and changes in cell shape and motility; of particular importance is the induction of cell proliferation in pathological contexts [2].

The retinal pigment epithelium (RPE), a monolayer of differentiated quiescent cells located between the neural retina and the choroid is involved in the trans-epithelial transport of nutrients, the storage and metabolism of vitamin A derivatives, the renewal of photoreceptor outer segments, and the ionic homeostasis of the sub-retinal space [3].

As the predominant component of the outer blood-retina barrier (BRB), the RPE plays an essential role in the maintenance of the functional and structural integrity of the neural retina, required for visual function. Under pathological conditions RPE cells may be exposed to serum-contained growth factors and pro-inflammatory agents, including thrombin generated by the activation of the coagulation cascade. Thrombin concentration can exhibit fast variations, reaching around 250 nM within minutes, in rhegmatogenous retinal detachment [4]. Exposure of RPE cells to thrombin results in the proliferation, dedifferentiation, and migration of RPE cells to the vitreous, and the subsequent assembly of contractile membranes on both retinal surfaces, which promotes retinal detachment. Based on these findings, exposure of RPE cells to thrombin has been associated with the development of Proliferative Vitreoretinopathy (PVR) [5]. Our previous work has demonstrated that thrombin promotes RPE cell proliferation [6], cytoskeletal remodeling [7] and cell migration [8]. However, molecular targets for the prevention of PVR have not been defined.

Given the nature of the catalytic and irreversible activation of PARs, different from classical GPCRs, their activity is tightly regulated [9]. The inactivation of thrombin-induced PAR1 signaling requires C-terminal phosphorylation and β -arrestin binding, which in turn uncouples G proteins from the receptor, desensitizing the receptor. Additionally, β -arrestin interaction with components of the endocytic machinery facilitates the recruitment of PAR1 to clathrin-coated pits and its

Abbreviations: Proliferative vitreoretinopathy, (PVR); Protease Activated Receptors, (PARs); Rab coupling protein, (RCP or RAB11FIP1); G-protein-coupled receptors, (GPCRs); Retinal pigment epithelium, (RPE)

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

E-mail address: acolome@ifc.unam.mx (A.M. López-Colomé).

<https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2020.109748>

Received 16 June 2020; Received in revised form 16 August 2020; Accepted 19 August 2020

Available online 27 August 2020

0898-6568/ © 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

internalization from the plasma membrane [10]. However, activated PAR1 sorting into early endosomes has been shown to be coincident with p38 phosphorylation, suggesting that p38 signaling may be initiated or sustained by PAR1 at endosomes [11]. Therefore, sorting into lysosomes for degradation is a critical issue for the termination of thrombin-induced PAR1 signaling.

Among the proteins known to regulate the internalization and recycling of GPCRs, the family of Rab GTPases controls cellular processes such as endocytosis, trafficking, endosome fusion and exocytosis. Among these proteins, Rab11a and Rab11b are required for PAR1 trafficking and the recycling of non-activated PAR1, whereas activated PAR1 is directed to lysosomes for degradation by Rab11a [11].

GTP-Rab activates different effector molecules [12,13] such as Rab11-family interacting proteins (Rab11-FIPs) which bind to a conserved 20 amino acid C-terminal domain called RBD (Rab11-binding domain). FIPs have been subdivided into two classes: Class I FIPs are characterized by an N-terminal C2 domain involved in phospholipid binding; whereas Class II FIPs bare an additional calcium-binding EF-hand motif [14]. Within class I FIPs, Rab coupling protein (RCP) is a ~ 85 kDa protein effector for Rab11a. RCP localizes predominantly to the Endocytic Recycling Compartment (ERC) and regulates transport from this compartment to the plasma membrane. The C2 domain of RCP mediate targeting to the plasma membrane by binding to Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate (PtdIns(3,4,5)P3) and phosphatidic acid [15]. In addition to N-terminal C2 domain and C-terminal RBD domain, RCPs have 3 functional PEST (Pro-Glu-Ser-Thr) motifs (182/249/336), which are believed to be a target for calcium-dependent calpain proteolysis [16]. Calpains are a family of calcium-activated cysteine proteases that catalyze the proteolysis of a number of cellular proteins in eukaryotes [17], and have been shown to regulate the internalization of membrane proteins through clathrin-coated vesicles [18].

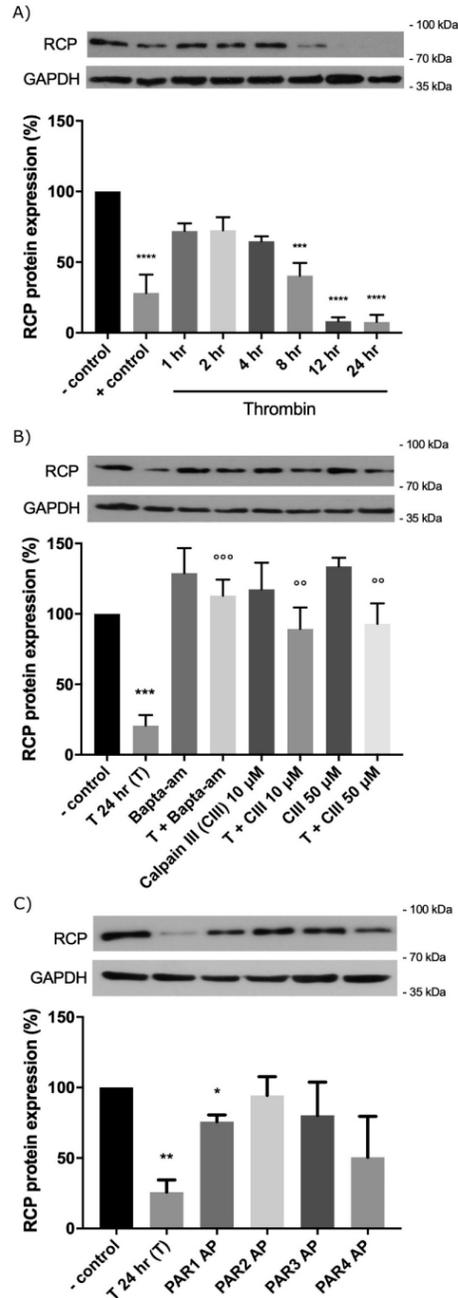
The assembly/disassembly of the Rab11a/RCP complex is involved in the regulation of protein trafficking at the plasma membrane, and stimulates cell migration [19]. Interestingly, the inhibition of calpain promotes RCP and Rab11a accumulation at the plasma membrane [15,16,20], suggesting the requirement of calpain-driven proteolysis for the internalization of Rab/RCP.

We have previously shown that thrombin stimulation of PAR1 induces an increase in intracellular calcium concentration and the subsequent activation of calpain. Moreover, we showed that thrombin-induced calpain activation regulates PAR1 internalization through α -spectrin degradation, since calpain activation and α -spectrin degradation are not induced by the activation of PARs 2,3 or 4. These data suggest that the mechanism that regulates PAR1 internalization differs from other PARs [21]. In the present study we further analyzed the regulation of PAR1 internalization in RPE cells and demonstrated that this process depends on the disassembly of the Rab11a/RCP complex through a novel mechanism not described previously. These findings contribute to the elucidation of the processes underlying the development of proliferative eye pathologies such as PVR.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

All reagents used were cell culture grade. Thrombin (605157) and Calpain inhibitor III (208722) were purchased from Calbiochem/EMD Millipore (Billerica, MA, USA). PAR1 (SFLLRNPNKYEPF-NH2), PAR2 (SLIGRL-NH2), PAR3 (SFNGGP-NH2) and PAR4 (GYPGKF-NH2) agonist peptides were from Bachem (Torrance, CA, USA). DMEM/F12 and Opti-MEM, Fetal bovine serum (FBS), Lipofectamine RNAi-MAX Transfection Reagent-Delivery of siRNA (13778-075), Lipofectamine LTX with Plus Reagent (15338-100), and Hoechst 33258 Pentahydrate (bis-Benzimide) were from Invitrogen/Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA USA). siRNA-RCP (SC76331), siRNA-Rab11a (sc-



(caption on next page)

36,340), anti-PAR1 (SC13503) and anti-Rab11a (SC166523) monoclonal antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology (CA, USA). CY5 (715–175-151), and Alexa Fluor 647 (115–605-003) were from Jackson ImmunoResearch (PA, USA). Anti-RCP (D9D8P) and anti-GAPDH (D4C6R) monoclonal antibodies were purchased from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). Protein G sepharose 4 Fast flow was from Amersham Biosciences (GE Healthcare Life Sciences; Chicago, IL, USA). DAKO Fluorescence Mounting Medium (S3023) was from Agilent (Santa Clara, CA, USA). LAMP1-mGFP (34831) was from Addgene (Watertown, MA, USA). All other reagents were from Sigma Aldrich (St. Louis MO, USA). RCP-YFP and CFP-Rab11a plasmids for fluorescence resonance energy transfer (FRET) experiments were a donation from Rytis Prekeris, Department of Cell and Developmental Biology, School of Medicine, University of Colorado Anschutz Medical Campus [13](Denver, CO, USA).

2.2. Cell culture

ARPE19 cell line derived from human RPE was used throughout (ATCC® CRL-2302™). Cells were grown in DMEM/F12 supplemented with 15 mM HEPES, 14.2 mM NaHCO₃, 0.5 mM sodium pyruvate, 0.005% penicillin-streptomycin, 0.01% neomycin, and 10% fetal bovine serum (FBS) pH 7.4. Cells were cultured as suggested by ATCC. For all assays, cultures were serum-deprived for 24 h prior to the experiment.

2.3. Cell stimulation

Cells were serum-deprived for 24 h and incubated in the presence of 2 U/mL thrombin or specific PAR agonists (50 μM) for the indicated period of time. When tested, Calpain inhibitor III was added at 50 μM 30 min prior to thrombin stimulation, and cell viability was examined in order to discard a toxic effect from this drug.

2.4. Western Blot anti-RCP

Cells were seeded into 6 well plates. Cells were stimulated with thrombin in serum free DMEM/F12 at room temperature. Cultures were then rinsed with PBS and lysed in 50 mM Tris-HCl pH = 7.4, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 1% CHAPS, 0.5% NP40, 0.1% BSA, and 10% P8340 protease inhibitor. Protein concentration was determined using bicinchoninic acid assay (Sigma Aldrich) and 35 μg of the total protein was used for protein immunoblot analysis. Laemmli buffer (0.75 mM Tris- HCl; pH 8.8, 5% SDS, 20% glycerol, 0.01% bromophenol blue, 10% β mercaptoethanol) was added to the lysates and samples were boiled for 5 min, resolved by SDS/PAGE (7.5%), and transferred onto nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences). After blocking for 1 h at room temperature with 7.5% non-fat milk in 0.1% Tween TBS, the membranes were probed with primary antibodies against α-RCP (1:5,000 in blocking buffer) or anti-Rab11a (1:2,000 in blocking buffer) overnight at 4 °C. Secondary HRP-conjugated antibody (1:10,000 in blocking buffer) was incubated for 1 h and membranes were developed using the Luminata TM Forte Western HRP Substrate (Millipore, Billerica, MA, USA). Anti-GAPDH (1:40,000 in blocking buffer) immunodetection was used as loading control. Kodak® film images were digitized using an Alpha DigiDoc system (Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA), and densitometry analysis was performed using the open source Fiji software.

2.5. Immunoprecipitation

Following lysis in 20 mM Tris-HCl; pH 8, 137 mM NaCl, 1% NP-40, 2 mM EDTA, 700 μg of protein were precleared with 25ul of mouse serum and 25ul of rabbit serum for 1 h at 4 °C. 50 μL G sepharose beads were added and further incubated for 30 min. Precleared lysates were incubated overnight at 4 °C in the presence of 2 μL of anti-Rab11a or

Fig. 1. Thrombin-induced calpain activation promotes RCP degradation. RCP protein expression was determined by western blot and expressed as % of negative control (unstimulated cells). 10% FBS was included as positive control. A) Thrombin (2 U/mL) promotes the time-dependent degradation of RCP. B) Cells were stimulated with thrombin for 24 h in the presence of 10 μM Bapta-AM, or 10 and 50 μM of the calpain inhibitor Calpain III. C) Cells were stimulated for 24 h with PAR 1–4 agonist peptides (APs): 2.5 μM PAR1-AP (SFLLRNPNDKYEPF); 25 μM PAR2-AP (FSLRLRY); 25 μM of PAR3-AP (SFNGGPP), 25 μM of PAR4-AP (AYPGKF). Results are expressed as the mean ± SEM of three independent experiments. Multiple comparison ANOVA and Tukey's test: α = 0.001 (****); α = 0.01 (***); α = 0.05 (**); α = 0.1 (*) referred to negative control. Or α = 0.01 (ooo); α = 0.05 (oo) referred to thrombin stimulation.

2 μL of anti-RCP and 50 μL G sepharose beads. Samples were rinsed with PBS, centrifuged for 5 min at 16500 ×g at 4 °C and resuspended in 30 μL Lysis Buffer. Laemmli buffer 2× was added, and samples were boiled for 3 min, and centrifuged for 5 min at 16500 ×g at 4 °C. The pellet was discarded and half of the remaining supernatant was resolved by SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences). Membranes were blocked 1 h at room temperature with 7.5% nonfat milk in 0.1% Tween TBS, the membranes were probed with primary antibodies against α-RCP (1:5,000 in blocking buffer) and anti-Rab11 (1:2,000 in blocking buffer) overnight at 4 °C. Secondary HRP-conjugated antibody (1:10,000 in blocking buffer) was incubated for 1 h.

2.6. FRET

RCP-YFP and CFP-Rab11a plasmids were kindly donated by Rytis Prekeri (University of Colorado, Anschutz Medical Campus). These probes have been previously characterized by this group regarding activity, specificity, efficiency and cellular localization [13]. Cells were seeded in 12 mm coverslips and transfected with RCP-YFP or CFP-Rab11a or co-transfected with both plasmids. Transfection was performed using Lipofectamine LTX and Plus Reagent in an antibiotic and serum free Opti-MEM for 16 h. Cells were incubated in DMEM-F12 10% FBS without antibiotics for 48 h, and the expression of fluorescent protein was verified by comparing total fluorescence in each channel using ZEN blue edition Carl Zeiss software (Jena, Germany). The amount of plasmid transfected was adjusted in order to attain equivalent expression. Cells were serum-deprived for 24 h prior to stimulation. When Calpain inhibitor III (CIII) was used, it was added 30 min prior to thrombin stimulation for 5 min at 37 °C. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde at room temperature for 12 min. We used DAKO as a fluorescence mounting medium. Images were obtained with confocal microscope LSM800 with 63× objective, numerical aperture 1.4. In FRET experiments CFP was excited at 433 nm; acceptable fluorescence range for emission was set at 475 nm, and we use the ± 50% of overlapping curve to excite YFP, YFP emission was collected at 527 nm. Additionally, in control experiments YFP was excited to 513 nm. We calculated FRET intensity (FRET_i) with FRET Analyzer Fiji plugin. These events are shown in the blue images in the lower panel of Figs. 3, 5 and S2. The intensity of these events is shown in a rainbow intensity scale, where dark blue corresponds to low intensity and white to high. FRET_i is an average from ten randomly picked cells [22,23]. We considered all the cells in the field for analysis. Only cells expressing similar amounts of CFP and YFP protein were included in the FRET analysis. In this analysis FRET_i images are converted to 8 bit gray-scale. Then, those events with an intensity over 10 pixels above background were taken into account for normalization. FRET_i was normalized (NFRET) using ZEN blue edition Carl Zeiss software (Jena, Germany). We used FRET_i values previously calculated, and CFP_i and YFP_i fluorescence intensity constants corresponding to the average intensity calculated for each channel. In order to take into account not only the average intensity of the signal, but all the events above background,

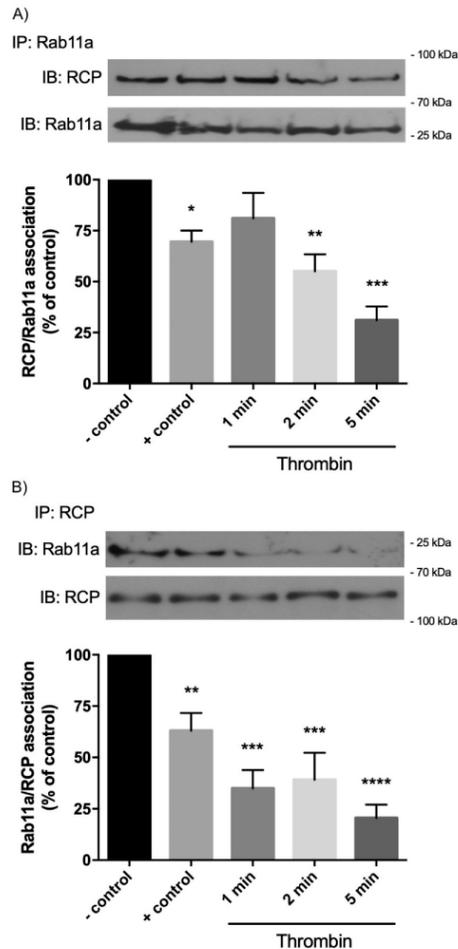


Fig. 2. Thrombin promotes Rab11a/RCP complex disassembly. Rab11a and RCP protein interaction was determined by immunoprecipitation. Non-stimulated cells were negative control. 10% FBS was included as positive control. Results are expressed as % association of Rab11a with RCP. A) Immunoprecipitation with anti-Rab11a. B) Immunoprecipitation with anti-RCP. Results are expressed as the mean \pm SEM of three independent experiments. Multiple comparison ANOVA and Tukey's test: $\alpha = 0.001$ (***); $\alpha = 0.01$ (**); $\alpha = 0.05$ (*); $\alpha = 0.1$ (*) referred to negative control.

each event was corrected by the equation $NFRET = FRET_i / CFP_i \times YFP_i$.

2.7. Gene silencing

Cells were seeded onto 12 mm cover glass. 50 pmol of siRNA-RCP or 50 pmol of siRNA-Rab11a were transfected using Lipofectamine RNAiMAX Reagent in an antibiotic and serum free Opti-MEM for 24 h as suggested by the manufacturer. Cells were stimulated with thrombin in DMEM/F12 serum free medium for 5 min at room temperature. Subsequently, cells were rinsed with PBS and incubated for 15 min at

37 °C. Cells were fixed for 12 min with 4% paraformaldehyde at room temperature.

2.8. Epifluorescence microscopy

Rab11a and RCP were silenced, stimulated and fixed as described above. When Calpain inhibitor III (CIII) was used, it was added 30 min prior thrombin stimulation for 5 min at 37 °C. To evaluate PAR1 presence at the membrane, cells were not permeabilized. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde at room temperature for 12 min. Then, they were blocked with 5% BSA for 1 h and incubated for 4 h at 4 °C with Santa Cruz anti-PAR1 antibody (1:500 in blocking buffer) (SC-13503) [24,25]. A secondary CY5 antibody was incubated for 1 h (1:1,000 in blocking buffer). Nuclei were stained with 0.1 mg/mL Hoechst 33258 Pentahydrate (bis-Benzimidazole) in PBS. Images were acquired with ACT-1 software in a Nikon microscope (Eclipse TE 2000-U) with DXM1200F camera and 40 \times objective (0.6 NA). Corrected Total Cell Fluorescence (CTCF) was calculated with ImageJ Software and normalized as percentage of control values.

2.9. Confocal microscopy

In order to confirm PAR1 lysosomal localization, cells were transfected with LAMP1-mGFP plasmid (lysosome marker), incubated for 48 h. and subsequently transfected with siRNA-RCP or siRNA-Rab11a (50 pmol) for 24 h. When CIII was used, it was included 30 min prior to thrombin stimulation for 5 min at 37 °C. From this point on, all procedures were carried at 4 °C. Cells were permeabilized with 0.4% X-100 triton for 1 h, blocked with 5% BSA for 1 h and incubated for 4 h with Santa Cruz anti-PAR1 antibody (1:500 in blocking buffer) (SC-13503). Anti-mouse-Alexa 647 antibody was incubated for 1 h (1:1,000 in blocking buffer). Images were obtained using an LSM 800 microscope with 63 \times objective, numerical aperture 1.4, with ZEN blue edition Carl Zeiss software (Jena, Germany). Colocalization analysis was performed using ZEN blue edition Carl Zeiss software colocalization module (Jena, Germany). All planes in Z were compiled by the module, and all the colocalization events were calculated based on this image. A colocalization event is defined as a pixel in which the intensity of both fluorescence channels is above the background threshold and is positive for Pearson's correlation coefficient.

2.10. Cell migration

ARPE19 cells were grown to 90% confluence in six-well plates (Costar; Corning, Inc., Washington, DC, USA) in DMEM-F12 containing 10% FBS. Cells were serum-deprived for 24 h. To assess cell migration, the cell monolayers were scratched mechanically with a pipette tip drawing a line. Scratched monolayers were transfected with siRNA-Rab11a and/or siRNA-RCP in serum-free DMEM-F12. Simultaneously, cells were incubated at 37 °C in the presence of 2 U/mL thrombin. At the end of the stimulation period, cells were fixed with 4% paraformaldehyde and visually examined by phase-contrast microscopy (Nikon Eclipse TS100 inverted microscope). Images were captured at 0, 24 and 48 h.

2.11. Proliferation assay

Proliferation was determined using a bromide [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) assay kit (Promega, Madison, WI, USA). The cells were incubated in 96-well culture plates (Corning, Corning, NY) at a concentration of 1×10^4 cells/well. Cells were transfected with siRNA-Rab11a and/or siRNA-RCP in serum-free DMEM-F12. Simultaneously, cells were incubated for 24 h at 37 °C in the presence of 2 U/mL thrombin. 20 μ L of 5 mg/mL MTS was added to each well for 1 h. The absorbance was recorded at 490 nm with a microplate reader (ELx800,

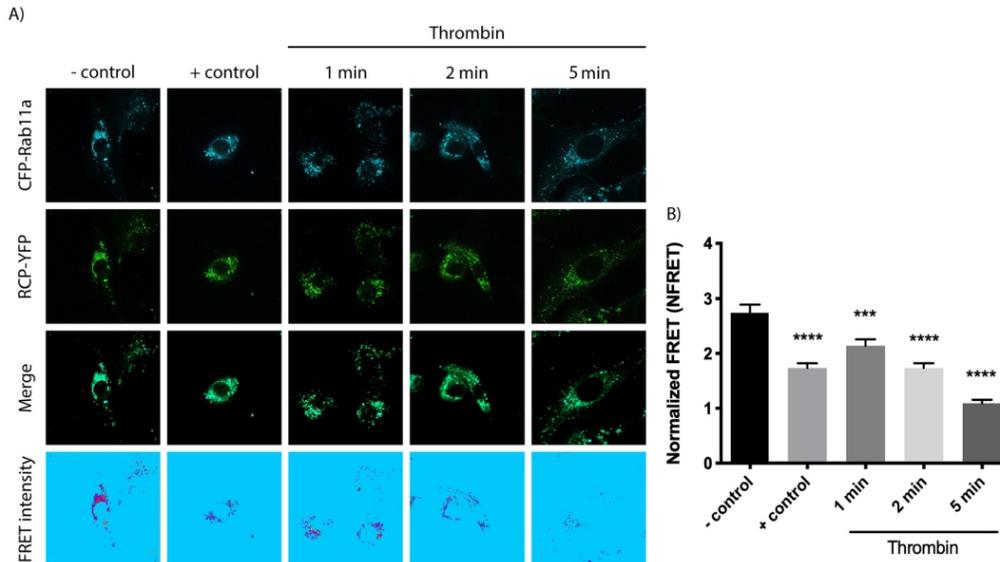


Fig. 3. Thrombin stimulation promotes CFP-Rab11a/RCP-YFP complex disassembly. We did FRET assays to evaluate CFP-Rab11a and RCP-YFP protein interaction was determined using FRET. Non-stimulated cells were negative control. 10% FBS was included as positive control. Cells that expressed comparative levels of CFP and YFP were chosen arbitrarily. For each condition 10 fields with one or two cells were analyzed and each experiment was repeated 3 times so 30 fields per condition in total. A) Cells were stimulated with 2 U/mL thrombin. CFP, YFP and merge channels are shown. The generation of FRET intensity (*FRET*) images is described in the Materials and methods section and correspond to the blue images in the lower panel. The intensity of FRET events is shown in a rainbow intensity scale, where dark blue corresponds to low intensity and white is the highest. B) Normalized FRET (*NFRET*) was calculated as described in materials and methods. Results are expressed as the mean \pm SEM of three independent experiments. Multiple comparison ANOVA and Tukey's test: $\alpha = 0.001$ (****); $\alpha = 0.01$ (***) referred to negative control. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Biotek, Winooski, VT, USA).

2.12. Statistical analysis

All results are expressed as the mean \pm SEM. Data for analysis were obtained from three independent experiments. Multiple comparison ANOVA and Tukey's post hoc test was applied to compare different conditions. Statistical analysis was performed in GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

3. Results

3.1. Thrombin promotes RCP degradation

RCP and Rab11a are involved in the trafficking of membrane proteins. RCP includes 3 functional PEST (Pro-Glu-Ser-Thr) motifs (182/249/336) which are calpain substrates [16]. We have shown that thrombin induces intracellular Ca^{2+} increase and the activation of calpain in ARPE19 cells [21]. Using western-blot anti-RCP, we here show that thrombin promotes the time-dependent degradation of RCP (Fig. 1 A). Results demonstrate that stimulation of ARPE19 cells by 2 U/mL thrombin for 12 h. decreases RCP protein level by ~80%. In order to determine calpain contribution to RCP degradation we analyzed the effect of calcium chelator Bapta-AM and calpain inhibitor III on this process and showed that thrombin-induced RCP degradation is abolished by both, the calcium chelator and the calpain inhibitor (Fig. 1 B), suggesting that RCP degradation depends on calpain activation by thrombin-induced calcium increase.

Among the four members of the Protease Activated Receptor family

(PAR1 to PAR4), PAR1 is the main responsible for Ca^{2+} entry and the subsequent activation of calpain [21]. In order to identify the specific receptor mediating RCP degradation, we tested the effect of PAR-Agonist Peptides. Similar to thrombin effect, PAR1 agonist peptide induced the degradation of RCP by ~25%. As expected, RCP degradation was not modified by PAR2, PAR3 or PAR4 agonist peptides (Fig. 1 C). Together, these results suggest that thrombin promotes RCP degradation by a mechanism involving calpain activation most likely by PAR1-dependent intracellular calcium increase.

3.2. Thrombin induces Rab11a/RCP complex disassembly

The activation of calpain is required for PAR1 internalization [21]. We next examined if cleavage of RCP by calpain is responsible for the disassembly of the Rab11a/RCP complex, necessary for the internalization of PAR1. To this end, we used immunoprecipitation with anti-Rab11a and anti-RCP antibodies, and demonstrated that thrombin promotes Rab11a/RCP complex disruption in a time-dependent manner. As shown in Fig. 2 A and B, thrombin stimulation for up to 5 min decreases Rab11a/RCP interaction to ~25% of that observed in non-stimulated cells. These results were confirmed by crossed immunoprecipitation vs Rab11a (Fig. 2 A) and vs RCP (Fig. 2 B). Fig. 2 B shows that dissociation of the Rab11a/RCP complex is attained at 1 min thrombin stimulation. We conclude from these data that thrombin-induced dissociation of the Rab11a/RCP protein complex is fast and time-dependent.

We further examined Rab11a/RCP complex dissociation by FRET in cells co-transfected with CFP-Rab11a and RCP-YFP tagged proteins. Fig. 3 shows FRET assays analyzed as Normalized FRET. Results showed

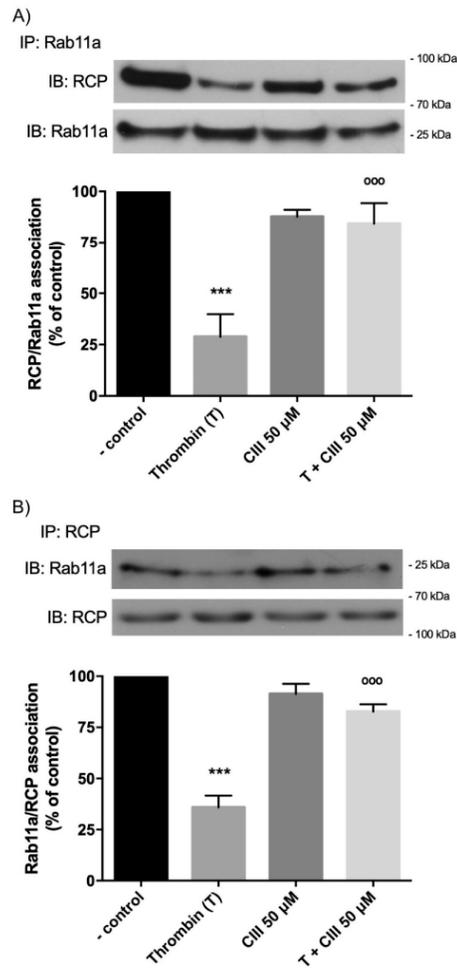


Fig. 4. Calpain regulates Rab11/RCP complex disassembly. We evaluated Rab11a and RCP protein interaction by immunoprecipitation. Results are expressed as percent association of Rab11a and RCP. Cells were stimulated for 5 min with 2 U/mL of thrombin in the presence of 50 μM calpain III inhibitor. A) Immunoprecipitation with anti-Rab11a. B) Immunoprecipitation with anti-RCP. Results are expressed as the mean \pm SEM of three independent experiments. Multiple comparison ANOVA and Tukey's test: $\alpha = 0.01$ (***) referred to negative control. Or with $\alpha = 0.01$ (ooo) referred to thrombin stimulation.

that thrombin promotes CFP-Rab11a/RCP-YFP complex dissociation in a time-dependent manner, further confirming results obtained by immunoprecipitation. Maximal dissociation (70%) of CFP-Rab11a/RCP-YFP complex was attained at 5 min thrombin stimulation. Together, these results confirm that thrombin induces the dissociation of the Rab11a/RCP complex in a time dependent manner.

3.3. Calpain regulates Rab11a/RCP complex disassembly

Our recent work has demonstrated that thrombin induces calcium-dependent calpain activation [21]. Since RCP contains three PEST motifs, substrates of calpain [16], we investigated the participation of calpain in the disassembly of Rab11a/RCP complex in cells stimulated with thrombin, by immunoprecipitation of Rab11a and RCP in the presence of calpain inhibitor III (Fig. 4). Results show that thrombin-induced dissociation of Rab11a/RCP complex is prevented by the inhibition of calpain (Fig. 4), as well as by immunoprecipitation vs Rab11a (Fig. 4 A) and vs RCP (Fig. 4 B). These results were further confirmed by FRET analysis in the presence of calpain inhibitor III (Fig. 5). As expected, CFP-Rab11a/RCP-YFP disassembly was completely prevented by the calpain inhibitor. In conclusion, these experiments show that Rab11a/RCP disassembly is regulated by thrombin-induced calpain activation.

3.4. PAR1 internalization requires Rab11a/RCP complex

In order to determine if the internalization of thrombin activated PAR1 requires Rab11a/RCP complex, we measured thrombin effect on PAR1 expression at the plasma membrane of cells transfected with siRNA-RCP or siRNA-Rab11a. We demonstrate in Fig. S1 that total protein expression of, RCP and Rab11a was silenced by ~75% and ~90% respectively, compared to negative controls (Fig. S1). We next examined the expression of PAR1 at the plasma membrane by epifluorescence microscopy in non-permeabilized cells (Fig. 6) using an anti-PAR1 tagged antibody with an epitope corresponding to amino acids 42–55 at the N-terminal extracellular segment. Thrombin reduced PAR1 membrane expression by 80% compared to non-stimulated cells (Fig. 6 A column 1). Calpain inhibition by a specific calpain inhibitor prevented thrombin-induced decrease in PAR1 at the membrane (Fig. 6 A column 2). This result was comparable to that observed upon the depletion of RCP (Fig. 6 A column 3) and Rab11a (Fig. 6 A column 4). Corrected Total Cell Fluorescence (CTCF) is shown in Fig. 6 B further confirming observations in panel A. Together, these results suggest that PAR1 expression at the cell surface is regulated by calpain and by the Rab11a/RCP complex.

3.5. Rab11a/RCP complex disassembly promotes PAR1 targeting to lysosomes

In order to determine if Rab11a/RCP complex disassembly is required for PAR1 lysosomal targeting for degradation, we examined the co-localization of PAR1 with the lysosomal-associated membrane protein 1-GFP (LAMP1-mGFP) in the presence of calpain inhibitor and siRNA-RCP or siRNA-Rab11a (Fig. 7). As expected, line-scan analysis revealed that co-localization of PAR1 and LAMP1 is increased in response to thrombin, compared to non-stimulated cells thus confirming that thrombin induces PAR1 lysosomal targeting [11,26]. Such increase was prevented by calpain inhibition, as well as by depletion of RCP and Rab11a mRNA (Fig. 7 B). We analyzed the total number of co-localization events on total confocal images and total cellular areas (Fig. 7 C). Results from these analyses confirm that thrombin promotes PAR1 degradation which requires the activation of calpain in the presence of Rab11a/RCP complex.

3.6. Rab11a/RCP complex inhibition induces an increase in migration and proliferation of thrombin-stimulated RPE cells

Our previous work has shown that thrombin stimulates the migration and proliferation of RPE cells, characteristic of PVR [6,8]. We here demonstrated that Rab11a/RCP complex inhibition prevents PAR1 internalization and could thus promote sustained PAR1 signaling. In order to determine if the inhibition of Rab11a/RCP complex disassembly induced by thrombin leads to increased cell migration or

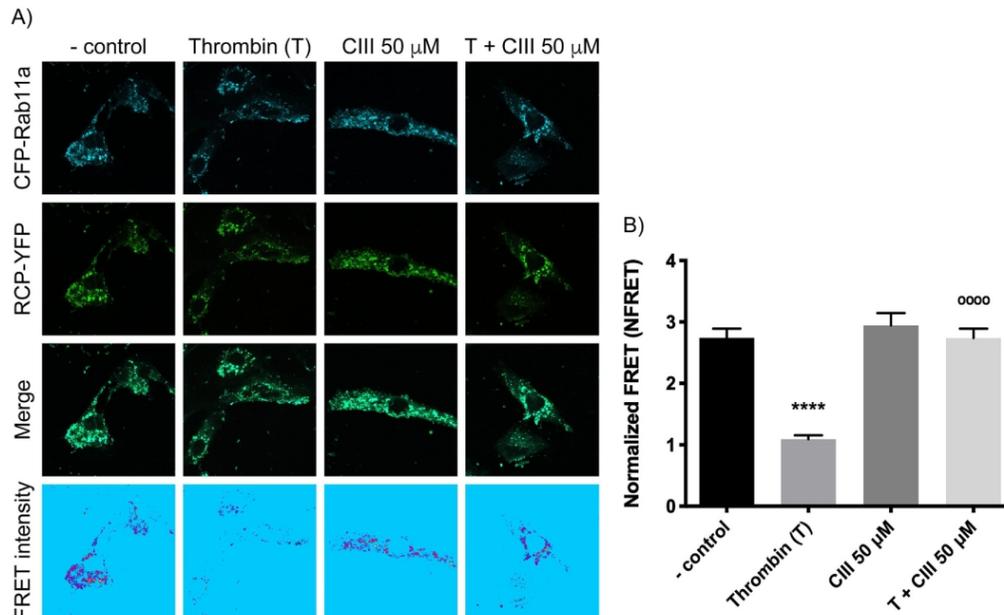


Fig. 5. FRET analysis shows that calpain regulates CFP-Rab11a/RCP-YFP complex disassembly. Cells were stimulated with thrombin for 5 min. The participation of calpain in CFP-Rab11a/RCP-YFP complex dissociation was analyzed. Cells that expressed comparative levels of CFP and YFP were chosen arbitrarily. For each condition 10 fields with one or two cells were analyzed and each experiment was repeated 3 times so 30 fields per condition in total. A) Cells were stimulated with 2 U/mL of thrombin in the presence of 50 μM calpain inhibitor III. CFP, YFP and merge channels are shown. The generation of FRET intensity (*FRET*) images is described in the Materials and methods section and correspond to the blue images in the lower panel. The intensity of FRET events is shown in a rainbow intensity scale, where dark blue corresponds to low intensity and white is the highest. B) Normalized FRET (*NFRET*) was calculated as described in materials and methods. Results are expressed as the mean \pm SEM of three independent experiments. Multiple comparison ANOVA and Tukey's test: $\alpha = 0.001$ (****) referred to negative control. Or with $\alpha = 0.001$ (oooo) referred to thrombin stimulation. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

proliferation, RPE cells were stimulated with 2 U/mL thrombin for 48 h in the presence of siRNA-Rab11a and/or siRNA-RCP and 50 μM of CIII. As expected, analysis of ARPE19 migration and proliferation in Fig. 8 shows that, migration and proliferation of ARPE19 were both increased by treatment with 2 U/mL thrombin. Importantly, inhibition of Rab11a/RCP complex with siRNA or a calpain inhibitor (CIII 50 μM) in stimulated RPE cells migration and proliferation to a higher extent itself, in agreement with the hypothesis that Rab11a/RCP complex inhibition promotes sustained PAR1 signaling.

4. Discussion

Thrombin effects are mediated by the activation of Protease-Activated Receptors (PARs), a family of G-protein-coupled receptors (GPCRs) activated by the proteolytic cleavage of the N-terminal sequence by thrombin. Given the catalytic nature of this process, the activation of PARs is irreversible, and differs from that of ligand-induced classical GPCR activation [9]. Consequently, the elucidation of the mechanisms involved in the termination of thrombin-induced PAR1 signaling and recycling is essential for developing strategies aimed at the prevention of proliferative diseases. We here report a novel mechanism involved in the regulation of thrombin-induced PAR1 internalization, through calpain-dependent Rab11a/RCP complex disassembly, required for PAR1 delivery to lysosomes for degradation.

Most GPCRs, including PAR1, are inactivated by phosphorylation and β -arrestin binding [27,28]. However, unlike most GPCRs, which

are internalized and then recycled back to the membrane, thrombin activated PAR1 is internalized, sorted directly to lysosomes and rapidly degraded, independently of β -arrestins [29,30]. This internalization process occurs through clathrin-coated pits and is dynamin-dependent [31]. It also depends on clathrin adaptor protein complex 2 (AP-2) through phosphorylation and ubiquitination-dependent mechanisms [32]. It has been proposed that AP-2 functions as an autophagic adaptor, that recognize and recruit's cargo from the endocytic pathway to the LCIII-mediated degradation pathway. This is achieved through the recruitment of a subset of the R4 family of "regulator of G protein signaling" (RGS) proteins [33]. However, little is known regarding the mechanisms that follow the activation of PAR1 and trigger receptor internalization. On this line, we have demonstrated that thrombin induces intracellular Ca^{2+} increase and the activation of calpain. Furthermore, thrombin-induced PAR1 internalization depends on calpain degradation of α -spectrin, a cytoskeletal protein whose degradation is essential for the formation of the endocytic vesicles [21]. The aim of the present work was to further define the signaling pathways involved in PAR1 internalization.

The Rab11 family of small GTPases, comprised by Rab11a, Rab11b, and Rab25, interact with adaptor- and distinct motor proteins to guide vesicles containing GPCRs along microtubule tracks or actin-filaments to distinct subcellular compartments [34]. Recently, Rab11a and Rab11b have been identified as critical regulators of PAR1 trafficking [11]. In this work, we identified RCP as a key player in PAR1 internalization process. RCP belongs to the class I Rab11-FIP subfamily. This

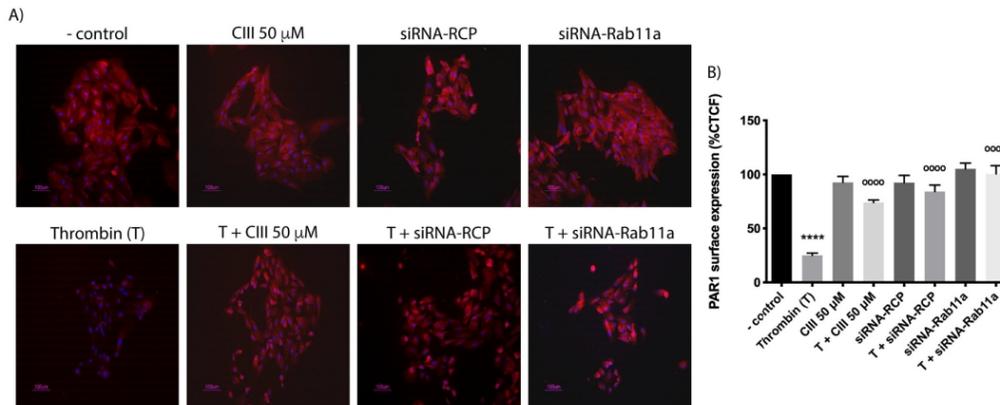


Fig. 6. Rab11a/RCP complex is involved in PAR1 internalization. We show in immunostaining assays that PAR1 is localized at the cell membrane in non-permeabilized cells. Non stimulated cells were negative control. Results are expressed as % PAR1 located at the plasma membrane. A) Cells were stained with anti-PAR1 and either left untreated (above) or stimulated for 5 min with 2 U/mL of thrombin (below). Column 1 represent control conditions; in column 2 cells were treated with 50 μ M calpain inhibitor III. In column 3, cells were treated with 50 pmol of siRNA-RCP or 50 pmol of siRNA-Rab11a (column 4). B) Cell clusters were chosen arbitrarily. Corrected Total Cell Fluorescence (CTCF) was calculated. Results are expressed as the mean \pm SEM of three independent experiments in which 5 fields per condition were analyzed for a total of 15 fields per condition. Multiple comparison ANOVA and Tukey's test: $\alpha = 0.001$ (****) referred to negative control. Or with $\alpha = 0.001$ (oooo) referred to thrombin stimulation.

protein has been shown to undergo calcium-dependent degradation which can be prevented by specific calpain inhibitors [16]. RCP protein dynamics at the plasma membrane are closely related to those of calpain [16], since RCP includes 3 calpain-interacting PEST sequences and binds Rab11a through a Rab-Binding domain (RBD) [15].

As a first approach to determine the possible role of RCP in PAR1 internalization, we examined RCP degradation by thrombin. Marie, et al. have shown that RCP is degraded in response to Ca^{+2} increase and calpain activation [16]. Our results demonstrate that thrombin induces time-dependent degradation of RCP (Fig. 1A). However, we were unable to identify degradation prior to 8 h post-stimulation. Since Marie, et al. induced calpain activation with milli molar concentration of $CaCl_2$, and PAR1 induces a much smaller Ca^{+2} increase [21], it is possible that it could take longer for thrombin to attain an equivalent level of degradation. However, thrombin-induced RCP degradation is also dependent on intracellular Ca^{+2} increase and calpain activation, since RCP degradation was prevented by the chelation of calcium or by the inclusion of the specific calpain inhibitor III (Fig. 1B). Using specific PAR agonist peptides, we identified PAR1 as the receptor responsible for promoting RCP degradation. PAR1 agonist peptide decreased RCP protein expression to a minor level as thrombin. Differences in stimulation between thrombin and PAR1 agonist peptide can be due to allosteric modulation of PARs signaling [35]. Peptide agonists for PARs 2–4 did not alter RCP degradation induced by thrombin (Fig. 1C) in agreement with our previous work showing that thrombin induces intracellular calcium increase mainly through PAR1 activation [21].

At the plasma membrane, RCP associates with Rab11a, through a specific RBD domain [36]. Since we were not able to detect thrombin-induced RCP degradation, we hypothesized that RCP might dissociate from Rab11a upon receptor activation. A novel finding of this work is the demonstration that Rab11a and RCP interact forming a complex in ARPE19 retinal cells. To define if thrombin-induced PAR1 internalization is triggered by Rab11a dissociation from RCP, we demonstrated that within minutes thrombin induces the disassembly of the Rab11a/RCP complex. This was demonstrated by immunoprecipitation assays and confirmed by FRET analysis using a Rab11a/RCP over-expression system (Figs. 2–3).

Immunoprecipitation and FRET analysis showed that disassembly of Rab11a/RCP complex depends on calpain activation. Calpain inhibitor III prevents thrombin-induced decrease in Rab11a/RCP complex interaction (Figs. 4 and 5). The inhibition of calpain is known to stimulate Rab11a and RCP membrane accumulation, thus supporting the requirement of calpain for the internalization of Rab11a and the arrest of PAR1 signaling [16,37]. Calpain is involved in cellular processes including membrane receptor internalization, endocytosis/exocytosis, Ca^{+2} -mediated processes, and intracellular membrane fusion, among others. On this line, some proteins of coated vesicles including clathrin light chain, tubulin, and adaptin are known calpain substrates [37].

Members of the Rab11 subfamily localize to the endosomal-recycling compartment and regulate trafficking through these compartments. Rab11 is predominantly involved in constitutive internalization of receptors such as TGF- β type I receptor [38], cannabinoid receptor 2 (CB2) [39], angiotensin II type 1 receptor (AT $_1$ R) [40], MAS1 receptor (GPCR) [41] and GPRC6A receptor [42]. In the present work we analyzed Rab11a participation in the degradation pathway, which is unrelated to constitutive internalization. Recently, Grimsey et al. have proposed that Rab11a and Rab11b serve distinct functions in the regulation of PAR1 intracellular trafficking; Rab11b being a key regulator of constitutively internalized PAR1 recycling, whereas Rab11a controls basal lysosomal degradation of the receptor [11].

Hereby we demonstrate that silencing of Rab11a or RCP prevented PAR1 internalization and targeting to lysosomes for degradation (Figs. 6 and 7). On this line, previous work from Grimsey et al. under basal conditions, showed that regardless of the cell type analyzed, depletion of Rab11b caused a significant decrease in basal PAR1 surface expression [11]. Even though it is technically possible that the Rab11a siRNA pool that we used mistargets Rab11b, we would expect a reduction on PAR1 surface expression. We show in Fig. 6 that thrombin-induced reduction in surface expression is prevented by the silencing of both RCP and Rab11a. Particularly, in basal conditions, neither siRNA-RCP nor siRNA-Rab11a, induce a significant reduction in PAR1 surface expression, therefore, even though it is possible that Rab11b plays a role, it is unlikely.

RCP requirement for PAR1 lysosomal targeting and degradation

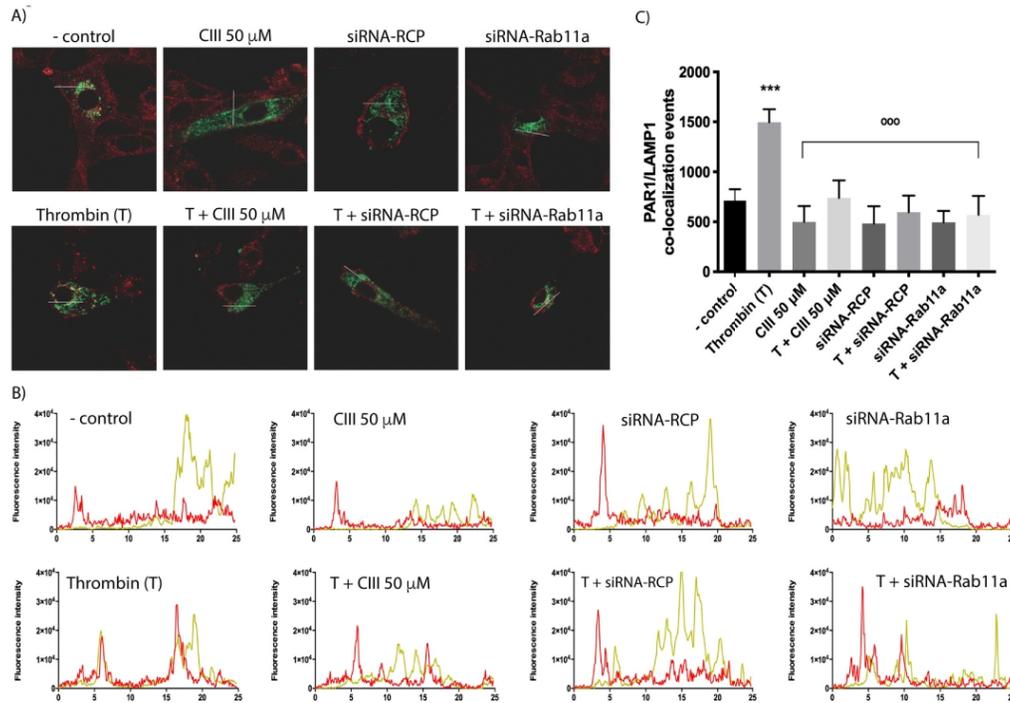


Fig. 7. Rab11a/RCP complex is involved in PAR1 lysosomal degradation. A) Cells were transfected with the lysosome marker LAMP-1-mGFP and stained with anti-PAR1 antibody (red). Co-localization was assessed in cells permeabilized with 0.4% triton X-100. Non-stimulated cells were negative control. Cells were stimulated with thrombin for 5 min. Cells that expressed both markers were chosen arbitrarily, 10 fields with one or two cells were analyzed and each experiment was repeated 3 times so 30 fields per condition in total. B) Line-scan analysis of the white dotted line region is plotted. C) We analyzed all colocalization events in all captured images. Results are expressed as the mean \pm SEM of three independent experiments. Multiple comparison ANOVA and Tukey's test: $\alpha = 0.01$ (***) referred to negative control. Or with $\alpha = 0.01$ (ooo) referred to thrombin stimulation. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

represents an important link in the mechanism involving receptor processing. In Fig. 7 we demonstrate that silencing of RCP, as well as of Rab11a inhibits PAR1 targeting to lysosomes. Moreover, since RCP dissociation is dependent on calpain activation, our present results suggest that this protease is a primary regulator of the internalization process.

We demonstrated that Rab11a/RCP complex inhibition induces sustained PAR1 signaling. As expected, migration and proliferation of ARPE19 cells were increased by thrombin stimulation. Notably, the inhibition of Rab11a/RCP complex with siRNA or a calpain inhibitor (CIII 50 μ M) induced an increase in migration and proliferation, indicating that Rab11a/RCP complex inhibition promotes a sustained PAR1 signaling. Like classic GPCRs, thrombin-activated PAR1 is rapidly phosphorylated and internalized, but unlike classic GPCRs, which recycle, internalized thrombin-activated PAR1 is sorted to lysosomes. Due to constitutive activation of PAR1, different of other GPCRs, degradation is needed to stop PAR1 signaling. Trejo, J. et al. showed that not degraded PAR1 has a signaling persisted even after thrombin was removed. This persistent signaling is apparently due to "resignaling" by previously activated receptors that had internalized and recycled back to the cell surface [26]. This result confirms that Rab11a/RCP complex is required for thrombin-activated PAR1 internalization and subsequent degradation.

In summary, we demonstrate for the first time, a novel mechanism involved in the regulation of GPCR internalization. The regulation of thrombin-activated PAR1 internalization is essential for the termination of PAR1 signaling. PAR1 internalization through Rab11a/RCP complex regulation is possibly a general phenomenon in most of PAR1 expressing cells, as well as in other GPCR-containing cells. The regulation of PAR1 internalization is particularly important in RPE due to its direct exposure to thrombin and the inflammation cascade.

Collectively, our work has demonstrated that thrombin promotes an increase in calcium concentration in RPE cells, and the consequent activation of calpain and the dissociation of the Rab11a/RCP complex which in turn regulates PAR1 internalization. The malfunction of PAR1 internalization and/or degradation pathway may lead to the abnormal increase in migration and proliferation of RPE cells, characteristic of proliferative eye diseases such as PVR.

The present analysis showed that PAR1 activation triggers its internalization and identified Rab11a/RCP complex disassembly as an essential process for thrombin activated PAR1 internalization since silencing of either Rab11a or RCP inhibits PAR1 internalization and delivery to lysosomes for degradation. Importantly, Rab11a/RCP complex inhibition promotes an increase in migration and proliferation of RPE cells, characteristic of proliferative eye diseases and the development of blindness.

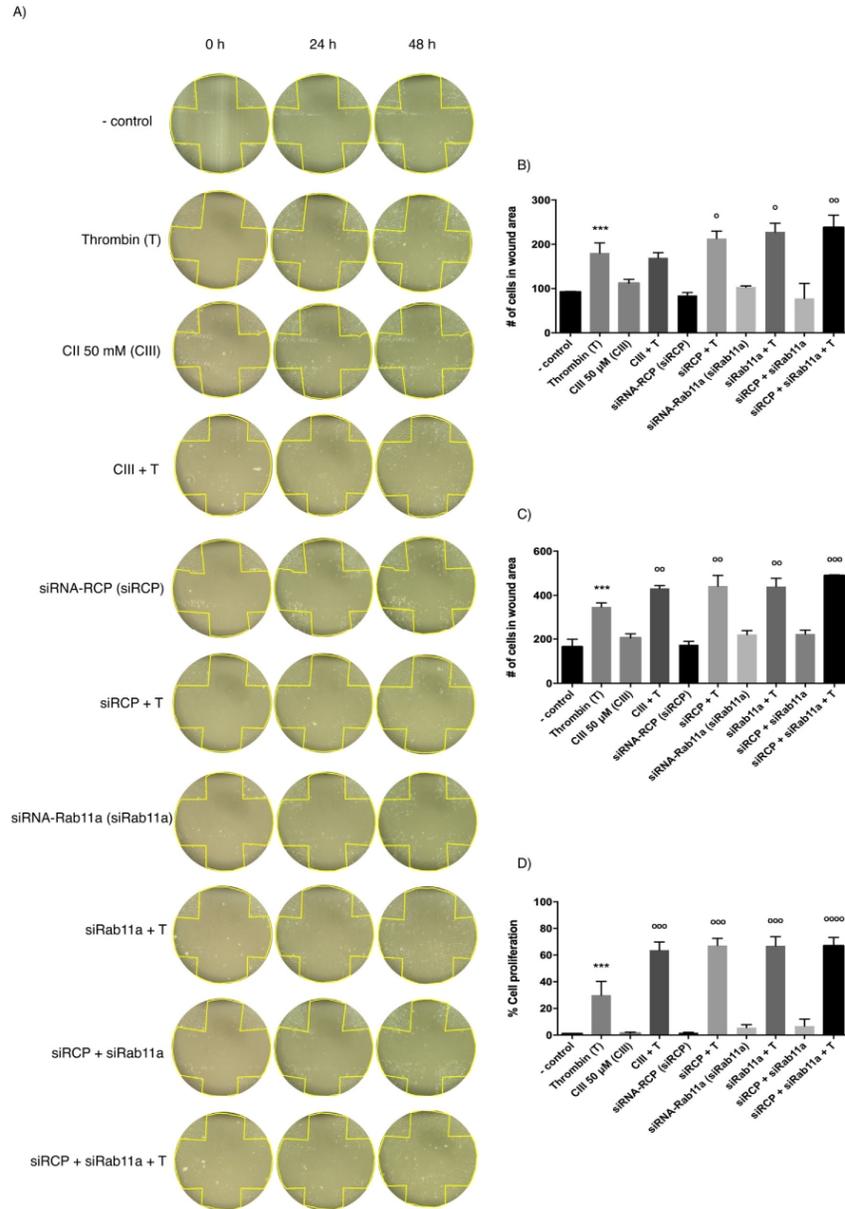


Fig. 8. Rab11a/RCP complex inhibition is involved in migration and proliferation of RPE cells. A-D) Confluent ARPE19 cells were serum-deprived for 24 h prior to stimulation with 2 U/mL of thrombin and 50 pm of siRNA-Rab11a, 50 pmol of siRNA-RCP, or CIII 50 μM inhibition. A) Cell migration was measured in a “wound healing” assay. Cells inside the wound were quantified and graphed. B) Cells were quantified at 24 h. C) Cells were quantified at 48 h. D) Proliferation was measured with MTS assay. Results are expressed as the mean ± SEM. Multiple comparison ANOVA and Tukey's test: α = 0.01 (***); α = 0.01 (**); α = 0.05 (°°); α = 0.1 (°) referred to thrombin stimulation. Or with α = 0.001 (°°°°); α = 0.01 (°°°); α = 0.05 (°°); α = 0.1 (°) referred to positive signal FRET control.

Funding

This work was partially supported by Grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) (Grant 254333) and Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT/UNAM) (Grant IN205317) to Ana María López-Colomé. Alejandro Alvarez-Arce is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received fellowship 573317 from CONACYT.

Acknowledgments

Authors acknowledge Rytis Prekeris, Department of Cell and Developmental Biology, School of Medicine, University of Colorado Anschutz Medical Campus, for the donation of CFP-Rab11a and RPC-YFP plasmids; Dr. Ruth Rincón Heredia and Dr. Abraham Rosas Arellano for technical assistance in FRET and confocal microscopy; Dr. Karla Méndez-Maldonado for support in plasmid amplification and purification.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2020.109748>.

References

- [1] S.R. Coughlin, Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology, *J Thromb Haemost.* (2005) 1800–1814.
- [2] K. Mihara, R. Ramachandran, M. Saifedine, K.K. Hansen, B. Renaux, D. Polley, S. Gibson, C. Vanderboor, M.D. Hollenberg, Thrombin-Mediated Direct Activation of Proteinase-Activated Receptor-2: Another Target for Thrombin Signaling, (2016), pp. 606–614.
- [3] O. Strauss, The retinal pigment epithelium in visual function, *Physiol. Rev.* 85 (2005) 845–881.
- [4] L.J.A.G. Ricker, Dieri R. Al, G.J.M. Beckers, E. Pels, A.T.A. Liem, F. Hendrikse, A. Kijlstra, H.C. Hemker, E.C. la Heij, High subretinal fluid procoagulant activity in rhegmatogenous retinal detachment, *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51 (2010) 5234–5239.
- [5] J. Bastiaans, J.C. van Meurs, V.C. Mulder, N.M.A. Nagtzaam, M. Smits-te Nijenhuis, D.C.M. Dufour-van den Goorbergh, P.M. van Hagen, H. Hooijkaas, W.A. Dik, The role of thrombin in proliferative vitreoretinopathy, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 55 (2014) 4659–4666.
- [6] A. Parrales, J.P. Palma-Nicolás, E. López, A.M. López-Colomé, Thrombin stimulates RPE cell proliferation by promoting c-Fos-mediated cyclin D1 expression, *J. Cell. Physiol.* 222 (2010) 302–312.
- [7] A.Y. Ruiz-Loredo, E. López, A.M. López-Colomé, Thrombin promotes actin stress fiber formation in RPE through rho/ROCK-mediated MLC phosphorylation, *J. Cell. Physiol.* 226 (2011) 414–423.
- [8] E.D. Aguilar-Solis, I. Lee-Rivera, A. Alvarez-Arce, E. López, A.M. López-Colomé, FAK phosphorylation plays a central role in thrombin-induced RPE cell migration, *Cell. Signal.* 36 (2017) 56–66.
- [9] N. Grimsey, A.G. Soto, J. Trejo, Regulation of protease-activated receptor signaling by post-translational modifications, *IUBMB Life* 63 (2011) 403–411.
- [10] C.H. Chen, M.M. Paing, J.A. Trejo, Termination of protease-activated receptor-1 signaling by β -arrestins is independent of receptor phosphorylation, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 10020–10031.
- [11] N.J. Grimsey, L.J. Coronel, I.C. Cordova, J. Trejo, Recycling and endosomal sorting of protease-activated receptor-1 is distinctly regulated by Rab11A and Rab11B proteins, *J. Biol. Chem.* 291 (2016) 2223–2236.
- [12] M.P. Müller, R.S. Goody, Molecular control of Rab activity by GEFs, GAPs and GDI, *Small GTPases* (2017) 00.
- [13] A.A. Peden, E. Schonteich, J. Chun, J.R. Junutula, R.H. Scheller, R. Prekeris, The RCP-Rab11 complex regulates endocytic protein sorting, *Mol. Biol. Cell* 15 (2004) 3530–3541.
- [14] E.E. Kelly, C.P. Horgan, C. Adams, T.M. Patzer, D.M.N. Sháilleabháin, J.C. Norman, M.W. McCaffrey, Class I Rab11-family interacting proteins are binding targets for the Rab14 GTPase, *Biol. Cell.* 102 (2010) 51–62.
- [15] A.J. Lindsay, M.W. McCaffrey, The C2 domains of the class I Rab11 family of interacting proteins target recycling vesicles to the plasma membrane, *J. Cell Sci.* 117 (2004) 4365–4375.
- [16] N. Marie, A.J. Lindsay, M.W. McCaffrey, Rab coupling protein is selectively degraded by calpain in a Ca²⁺-dependent manner, *Biochem. J.* 389 (2005) 223–231.
- [17] D.E. Goll, V.F. Thompson, H. Li, W. Wei, J. Cong, The calpain system, *Physiol. Rev.* 83 (2003) 731–801.
- [18] Y. Huang, K.K.W. Wang, The calpain family and human disease, *Trends Mol. Med.* 7 (2001) 355–362.
- [19] P.T. Caswell, M. Chan, A.J. Lindsay, M.W. McCaffrey, D. Boettiger, J.C. Norman, Rab-coupling protein coordinates recycling of α 5 β 1 integrin and EGFR1 to promote cell migration in 3D microenvironments, *J. Cell Biol.* 183 (2008) 143–155.
- [20] C.P. Horgan, M.W. McCaffrey, The dynamic Rab11-FIPs, *Biochemical Society Transactions, Biochem Soc Trans.* 2009, pp. 1032–1036.
- [21] A. Alvarez-Arce, I. Lee-Rivera, E. López, A. Hernández-Cruz, A.M. López-Colomé, Thrombin-induced calpain activation promotes protease-activated receptor 1 internalization, *Int. J. Cell Biol.* 2017 (2017).
- [22] M. Hachet-Haas, N. Converset, O. Marchal, H. Matthes, S. Gioria, J.L. Galzi, S. Legat, FRET and colocalization analyzer - a method to validate measurements of sensitized emission FRET acquired by confocal microscopy and available as an ImageJ plug-in, *Microsc. Res. Tech.* 69 (2006) 941–956.
- [23] T. Jin, L. Yue, J. Li, In vivo interaction between dynamitin and MacMARCKS detected by the fluorescent resonance energy transfer method, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 12879–12884.
- [24] J.R. Weinstein, A.L. Lau, L.F. Brass, D.D. Cunningham, Injury-related factors and conditions down-regulate the thrombin receptor (PAR-1) in a human neuronal cell line, *J. Neurochem.* 71 (1998) 1034–1050.
- [25] U. Zacharias, C.J. He, J. Hägege, Y. Xu, J.D. Sraer, L.F. Brass, E. Rondeau, Thrombin and phorbol ester induce internalization of thrombin receptor of human mesangial cells through different pathways, *Exp. Cell Res.* 216 (1995) 371–379.
- [26] J. Trejo, S.R. Hammes, S.R. Coughlin, Termination of signaling by protease-activated receptor-1 is linked to lysosomal sorting, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 13698–13702.
- [27] K. Ishii, J. Chen, M. Ishii, W.J. Koch, N.J. Freedman, R.J. Lefkowitz, S.R. Coughlin, Inhibition of thrombin receptor signaling by a G-protein coupled receptor kinase. Functional specificity among G-protein coupled receptor kinases, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 1125–1130.
- [28] M.M. Paing, A.B. Stutts, T.A. Kohout, R.J. Lefkowitz, J. Trejo, β -arrestins regulate protease-activated receptor-1 desensitization but not internalization or down-regulation, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 1292–1300.
- [29] J.A. Hoxie, M. Ahuja, E. Belmonte, S. Pizarro, R. Parton, L.F. Brass, Internalization and recycling of activated thrombin receptors, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 13756–13763.
- [30] J.A. Trejo, S.R. Coughlin, The cytoplasmic tails of protease-activated receptor-1 and substance P receptor specify sorting to lysosomes versus recycling, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 2216–2224.
- [31] J.A. Trejo, Y. Altschuler, H.W. Fu, K.E. Mostov, S.R. Coughlin, Protease-activated receptor-1 down-regulation. A mutant HeLa cell line suggests novel requirements for PAR1 phosphorylation and recruitment to clathrin-coated pits, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 31255–31265.
- [32] B. Chen, M.R. Dores, N. Grimsey, I. Canto, B.L. Barker, J.A. Trejo, Adaptor protein complex-2 (AP-2) and epsin-1 mediate protease-activated receptor-1 internalization via phosphorylation- and ubiquitination-dependent sorting signals, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 40760–40770.
- [33] B. Chen, D.P. Siderovski, R.R. Neubig, M.A. Lawson, J. Trejo, Regulation of protease-activated receptor 1 signaling by the adaptor protein complex 2 and R4 subfamily of regulator of G protein signaling proteins, *J. Biol. Chem.* 289 (2014) 1580–1591.
- [34] H. Stenmark, Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10 (2009) 513–525.
- [35] I. Canto, U. Soh, J. Trejo, Allosteric modulation of protease-activated receptor signaling, *Mini Rev. Med. Chem.* 12 (2012) 804–811.
- [36] P. Lall, A.J. Lindsay, S. Hanscom, T. Kecman, E.S. Taglauer, U.M. McVeigh, E. Franklin, M.W. McCaffrey, A.R. Khan, Structure-function analyses of the interactions between Rab11 and Rab14 small GTPases with their shared effector Rab coupling protein (RCP), *J. Biol. Chem.* 290 (2015) 18817–18832.
- [37] K. Sato, Y. Saito, S. Kawashima, Identification and characterization of membrane-bound calpains in clathrin-coated vesicles from bovine brain, *Eur. J. Biochem.* 230 (1995) 25–31.
- [38] K. He, X. Yan, N. Li, S. Dang, L. Xu, B. Zhao, Z. Li, Z. Lv, X. Fang, Y. Zhang, Y.G. Chen, Internalization of the TGF- β type I receptor into caveolin-1 and EEA1 double-positive early endosomes, *Cell Res.* 25 (2015) 738–752.
- [39] N.L. Grimsey, C.E. Goodfellow, M. Dragnunow, M. Glass, Cannabinoid receptor 2 undergoes Rab5-mediated internalization and recycles via a Rab11-dependent pathway, *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1813 (2011) 1554–1560.
- [40] J. Bian, S. Zhang, M. Yi, M. Yue, H. Liu, The mechanisms behind decreased internalization of angiotensin II type 1 receptor, *Vasc. Pharmacol.* 103–105 (1–7) (2018).
- [41] L. Sheng, M. Christopher, HHS public access, *Physiol. Behav.* 176 (2016) 100–106.
- [42] S.E. Jacobsen, I. Ammendrup-Johnsen, A.M. Jansen, U. Gether, K.L. Madsen, H. Bräuner-Osborne, The GPRC6A receptor displays constitutive internalization and sorting to the slow recycling pathway, *J. Biol. Chem.* 292 (2017) 6910–6926.