

Departamento de Fisiología  
Facultad de Medicina  
Universidad de Alcalá

**CONSECUENCIAS ESTRUCTURALES Y  
FUNCIONALES DE LA DELECIÓN  
CONDICIONAL DE LA QUINASA LIGADA A  
INTEGRINAS (ILK) EN ANIMALES ADULTOS**

Tesis Doctoral  
2010

Isabel Serrano Martínez  
Licenciada en Farmacia

D<sup>a</sup> MARIA LUISA DíEZ MARQUÉS, PROFESORA TITULAR DE LA UNIVERSIDAD DE ALCALÁ Y DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA

**CERTIFICA:**

Que la Tesis Doctoral titulada: *“Consecuencias estructurales y funcionales de la delección condicional de la Quinasa ligada a Integras (ILK) en animales adultos”*, presentada por *Dña. Isabel Serrano Martínez* para optar al Título de Doctora por la Universidad de Alcalá, y realizada bajo la dirección de la Dra. D<sup>a</sup> Piedad Ruiz Torres y la codirección del Dr. D. Diego Rodríguez Puyol, cumple todos requisitos legales para proceder a su defensa.

Y, para que conste y surta todos los efectos oportunos, firma el presente certificado en Alcalá de Henares, a 4 de febrero de 2010.



UNIVERSIDAD DE ALCALÁ  
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA  
Facultad de Medicina

*M<sup>a</sup> Luisa Díez*

Fdo.: Dra. D<sup>a</sup> M<sup>a</sup> Luisa Díez Marqués

**Dña. Piedad Ruiz Torres, Investigadora del Programa “Ramón y Cajal”, adscrita al Departamento de Fisiología y D. Diego Rodríguez Puyol, Jefe de Nefrología del Hospital Príncipe de Asturias y Profesor Asociado del Departamento de Medicina de la Universidad de Alcalá, como Directora y Codirector**

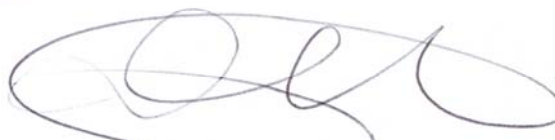
**CERTIFICAN:**

Que la Tesis Doctoral titulada: *“Consecuencias estructurales y funcionales de la delección condicional de la Quinasa ligada a Integrinas (ILK) en animales adultos”*, presentada por *Dña. Isabel Serrano Martínez* para optar al Título de Doctora por la Universidad de Alcalá, y realizada bajo su dirección, cumple todos requisitos legales para proceder a su defensa.

Y, para que conste y surta todos los efectos oportunos, firman el presente certificado en Alcalá de Henares, a 4 de febrero de 2010.



Fdo.: Dra. Dª Piedad Ruiz Torres



Fdo.: Dr. D. Diego Rodríguez Puyol

Toda una vida escondida  
para alumbrar lo que la vida esconde

A mis padres  
A Elena  
A João

## Agradecimientos

Al Dr. Rodríguez Puyol por la oportunidad de trabajar en su laboratorio, confiar en mí y conseguir que estos cinco años de trabajo culminen con la preparación de esta tesis.

A la Dra. Díez Marqués por la constante dedicación que me ha prestado.

A los dos, queridos Manolo y Luisa, gracias por enseñarme el camino y ayudarme a recorrerlo.

Al Dr. Rodríguez Puyol por su ejemplo y a la Dra. Ruiz Torres por su optimismo, disponibilidad y energía. Para vosotros, Diego y Maripi, mi agradecimiento por dirigir este trabajo y por hacer realidad mi ilusión.

A Marta, mi compañera de viaje, por su ayuda en los repechos de este camino.

A todas las demás personas que forman este gran Grupo de Investigación de la Universidad de Alcalá, gracias por vuestra ayuda.

Al Dr. Ruoslahti por ampliar mi horizonte al trabajar a su lado.

Al Ministerio de Educación y a la Fundación para Investigación Biomédica del Hospital Príncipe de Asturias por su soporte económico.

Y

A mi padre, mi fuente de sabiduría. A mi madre, mi motor y combustible. A mi hermana por ser mi inspiración, y a mi *alter ego*, João, por hacerme querer ser mejor cada día.

Gracias por vuestra comprensión con esta profesión tan apasionantemente complicada. Sois mi apoyo, mi equipo... mi familia.



RESUMEN.SUMMARY.....	i
ABREVIATURAS.....	iii

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
---------------------	----------

1. Matriz extracelular.....	4
1.1. Composición y función.....	4
1.2. Mecanismos de síntesis y degradación.....	4
2. Interacciones célula-matriz extracelular. Integrinas.....	7
2.1. Tipos y funciones.....	7
2.2. Complejos de adhesión focal y unión al citoesqueleto.....	8
3. Transmisión de las señales <i>inside-out</i> y <i>outside-in</i> .....	9
3.1. Señalización <i>inside-out</i> .....	9
3.2. Señalización <i>outside-in</i> .....	10
4. Proteína quinasa ligada a integrinas (ILK).....	11
4.1. Estructura.....	11
4.2. Plataforma de conexión.....	12
4.3. Señalización.....	14
5. Papel fisiológico de ILK en el desarrollo normal de tejidos.....	17
6. Procesos fisiopatológicos en los que participa ILK.....	19
6.1. ILK en la estructura y función cardiovascular.....	19
6.2. Remodelado vascular.....	21
6.3. ILK en la estructura y función de la piel.....	22
7. Un modelo experimental de reparación tisular: la herida.....	24
8. Óxido Nítrico como modulador de la función vascular.....	29
8.1. Óxido nítrico sintasas.....	29
8.2. Vías de señalización del NO. La guanilato ciclasa soluble (sGC) como receptor intracelular del NO.....	30
8.3. Vías de señalización del NO. La proteína quinasa G (PKG) como efector celular del cGMP.....	33
9. Metodología del knock-out condicional para ILK.....	34
9.1. El sistema Cre- <i>loxP</i> .....	34
9.2. Combinación con un sistema inducible: Tamoxifeno.....	36



<b>HIPÓTESIS</b>	<b>41</b>
------------------	-----------

<b>OBJETIVOS</b>	<b>45</b>
------------------	-----------

<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>49</b>
-----------------------------	-----------

1. Estudios <i>in vivo</i> .....	49
1.1. Animales de experimentación.....	49
1.2. Diseño experimental.....	49
1.2.1. Medida de presión arterial y respuesta a la estimulación de la sGC y la PKG.....	49
1.2.1.1. Inducción de taquifilaxia.....	50
1.2.1.2. Modelo experimental de hipertensión aguda con angiotensina II.....	50
1.2.2. Modelo experimental de herida.....	51
1.2.3. Modelo experimental de electroporación de HGF.....	52
1.2.4. Organización de recogida de muestras.....	52
1.3. Técnicas empleadas.....	52
1.3.1. Histología.....	52
1.3.2. Extracción y medida del ADN.....	53
1.3.2.1. Análisis por PCR.....	53
1.3.3. Determinación de niveles proteicos.....	54
1.3.3.1. Análisis por Western Blot.....	54
1.3.3.2. Ensayo de ELISA.....	56
1.3.3.3. Ensayo de inmunohistoquímica.....	56
2. Estudios <i>ex vivo</i> .....	58
2.1. Diseño experimental.....	58
2.2. Técnicas empleadas.....	58
2.2.1. Análisis por western blot.....	58
2.2.2. Radioinmunoensayo.....	58
2.2.3. Reactividad vascular.....	59
3. Estudios <i>in vitro</i> .....	61
3.1. Cultivo primario de fibroblastos embrionarios de ratón.....	61
3.2. Diseño experimental.....	62
3.2.1. Obtención de MEF <i>knock-out</i> para ILK.....	62

3.3.	Técnicas empleadas.....	62
3.3.1.	Ensayo de inmunofluorescencia.....	62
3.3.2.	Herida <i>in vitro</i> y análisis del cierre.....	63
3.3.3.	Determinación de la proliferación celular: ensayo WST-1.....	63
4.	Análisis estadístico.....	65

## RESULTADOS 69

1.	Generación del modelo experimental <i>knock-out</i> condicional de ILK en ratones Cre-lox.....	69
1.1.	Pautas de administración del 4-OH-tamoxifeno.....	70
2.	Déficit de ILK y función vascular.....	73
2.1.	Expresión de ILK en aorta de ratones Cre-lox tratados con tamoxifeno.....	73
2.2.	Consecuencias del déficit de ILK.....	73
2.3.	Respuesta al óxido nítrico y a análogos del cGMP <i>in vivo</i> y <i>ex vivo</i> .....	74
2.3.	Implicaciones del déficit de ILK en condiciones fisiopatológicas.....	78
3.	Déficit de ILK y mecanismos de reparación tisular.....	80
3.1.	Expresión de ILK en piel de ratones Cre-lox tratados con tamoxifeno.....	80
3.2.	Cierre herida <i>in vivo</i> .....	81
3.3.	Cierre herida <i>in vitro</i> .....	85
3.4.	Expresión de HGF en heridas y MEF.....	88
3.5.	El retardo en el cierre de la herida es debido al descenso en la expresión de HGF.....	89
3.6.	Análisis de los mecanismos moleculares implicados.....	90

## DISCUSIÓN 96

## SUMARIO DE RESULTADOS 107

## CONCLUSIONES 111

## BIBLIOGRAFÍA 115

La quinasa ligada a integrinas (ILK) es un efector intracelular de las interacciones entre la célula y la matriz extracelular y regula muchos procesos celulares como crecimiento, proliferación, supervivencia, diferenciación, migración, invasión y angiogénesis. Aunque su papel ha sido ampliamente estudiado durante el desarrollo, poco se conoce sobre su función en la regulación y reparación de tejidos en animales adultos.

Con el objetivo de analizar el papel de ILK en la homeostasis de tejidos, se desarrollaron ratones adultos con delección condicional de ILK, mediante el sistema Cre-lox. En primer lugar se analizó el efecto de la delección de ILK en la función vascular. Los ratones deficientes en ILK mostraron en la pared del vaso un incremento en la expresión de dos proteínas implicadas en la respuesta celular al óxido nítrico (NO), la guanilato ciclasa soluble y la proteína quinasa G (PKG), con una mayor respuesta hipotensora tras la administración de donadores de óxido nítrico y agonistas de la PKG. Además, estos ratones fueron capaces de responder a nitroprusiato sódico (SNP), aún después de la inducción de tolerancia al NO con un tratamiento crónico con dinitrato de isosorbide, observándose un descenso en la presión arterial que no fue observado en los animales con ILK intacta. El efecto vasodilatador de SNP fue también

mayor en los ratones deficientes en ILK a los que se indujo una hipertensión aguda por angiotensina II. En segundo lugar se analizó la implicación de ILK en la reparación tisular eligiendo el modelo de reparación de heridas cutáneas. El déficit de ILK condujo hacia un enlentecimiento en el cierre de la herida cutánea y una disminución de la proliferación celular. La deceleración fue acompañada de una disminución en la expresión proteica de HGF durante el proceso de reparación de la herida. De manera significativa, las alteraciones en la proliferación celular y en el cierre de la herida se revirtieron por la administración exógena de HGF humano en los animales deficientes en ILK. El análisis de los mecanismos intracelulares implicados en este proceso reveló que la herida promovió una rápida activación de la PI3K e ILK necesaria para que se produjera el aumento en HGF que se indujo con la herida. De esta manera, PI3K parece jugar un papel central en la modulación de ILK que, como parece, ejerce de mediador en la síntesis de HGF. En conclusión, la activación de ILK parece ser decisiva para que se pongan en marcha los mecanismos de reparación tisular dependientes de la sobreexpresión de HGF.

Integrin-linked kinase (ILK) is an intracellular effector of cell-matrix interactions and regulates many cellular processes, including growth, proliferation, survival, differentiation, migration, invasion and angiogenesis. Although its role has been wide studied during the development, little is known about its function in tissue function and repair in adult animals.

With the objective to analyze the ILK role in tissue homeostasis, adult mice with conditional knock-out of the ILK gene were generated with the Cre-lox system. First, the consequences of the ILK deletion in the vascular function were analyzed. The ILK deficient mice show an increase in two proteins in the vascular aortic wall involved in cellular response to nitric oxide, the guanylyl cyclase and the protein kinase G (PKG). This increase does not affect to the basal values of systolic pressure but leads to an enhanced response to the nitric oxide (NO) donors and cGMP analogues. Further, these animals were able to restore the isosorbide dinitrate tolerance to NO donors and promote a decrease arterial pressure in response to sodium nitropruside (SNP) administration, which was not shown in the animals with intact

ILK. The enhanced SNP response was also higher in the ILK deficient mice after angiotensin II-induced hypertension. In second place, the ILK implication in tissue repair was studied choosing a cutaneous wound healing model. ILK deficiency leads toward decreased wound healing closure in skin and decreased cell proliferation, showing that its activation is necessary in tissue repair. This deceleration seems to be due to a decrease HGF protein expression during wound healing. Significantly, alterations in cell proliferation and forward wound closure could be rescued by exogenous administration of human HGF plasmid in the ILK-deficient mice. The analysis of the intracellular mechanisms involved in this process reveal that wound promotes to a rapid activation of PI3kinase and ILK, necessary to the increase of HGF expression during the wound healing. Herein, PI3kinase seems to play a central role in the ILK modulation which, at its turns, plays a pivotal role in HGF synthesis. In conclusion, the activation of ILK seems to be decisive to start the mechanisms of tissue repair dependent on HGF overexpression.

4-OHT	4-hidroxi(OH)-tamoxifeno
8-Br	3'5'-monofosfato sódico de 8-Bromoguanosina
All	Angiotensina II
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Akt/PKB	Proteína quinasa B ( <b>Protein Kinase B</b> )
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosintrifosfato
cGMP	Guanosina monofosfato cíclico ( <b>cyclic Guanosine MonoPhosphate</b> )
COL I	Colágeno I
COL IV	Colágeno IV
CT	Control
C-terminal	Región carboxilo terminal
db-cGMP	Dibutilil guanosin monofosfato cíclico ( <b>dibutilil cyclic Guanosine MonoPhosphate</b> )
d	Días
DAB	Diaminobencidina
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco ( <b>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</b> )
DT3	Inhibidor de la Proteína quinasa G ( <b>Peptide-based inhibitor of protein kinase G</b> )
EDTA	Etilen diamino tetraacético
EGF	Factor de crecimiento epitelial ( <b>Epithelial Growth Factor</b> )
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima ( <b>Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay</b> )
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial ( <b>endothelial Nitric Oxide Sintase</b> )
EPCs	Células endoteliales progenitoras ( <b>Endothelial Progenitor Cells</b> )
ER	Receptor de estrógeno ( <b>Estrogen Receptor</b> )
ERK	Proteína quinasa regulada por señales extracelulares ( <b>Extracelular signal-Regulated Kinase</b> )
FBS	Suero fetal bovino ( <b>Foetal Bovine Serum</b> )
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa ( <b>GlycerAldehyde 3-Phosphate DeHydrogenase</b> )
GSK3β	Glicógeno sintasa quinasa 3β ( <b>Glycogen Synthase Kinase 3β</b> )
h	Horas
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos ( <b>Hepatocyte Growth Factor</b> )
hHGF	HGF humano
Hsp90	Proteína de choque térmico de 90 kDa ( <b>Heat Shock Protein</b> )
IBMX	Isobutilmetilxantina

IDN	Dinitrato de isosorbide ( <i>Isosorbide DiNitrate</i> )
ILK	Quinasa ligada a integrinas ( <i>Integrin Linked Kinase</i> )
ILKAP	Proteína asociada a ILK ( <i>ILK-Associated Phosphatase protein</i> )
i.p	Intraperitoneal
kb	Kilobases
kDa	Kilodalton
KO	Silenciado ( <i>Knock-Out</i> )
LDL	Lipoproteínas de baja densidad ( <i>Low Density Proteins</i> )
LY	Inhibidor LY294002
MAPKs	Proteínas quinasas activadas por mitógenos ( <i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i> )
MEC	Matriz Extracelular
MEF	Fibroblastos embrionarios de ratón ( <i>Mice Embryonic Fibroblasts</i> )
Mit	Mitomicina C
MLC	Cadena ligera de miosina ( <i>Myosin Light Chain</i> )
MMPs	Metaloproteasas de matriz ( <i>Matrix MetalloProteinases</i> )
mTOR	<i>Mammalian Target Of Rapamycin</i>
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato ( <i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i> )
NO	Óxido nítrico ( <i>Nitric Oxide</i> )
NOSs	Óxido nítrico sintasas ( <i>Nitric Oxide Synthases</i> )
N-terminal	Región amino terminal
ODQ	(1,2,4)Oxadiazol(4,3-a)quinoxalina-1-uno
o/n	Por la noche ( <i>Over Night</i> )
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
PBS	Solución salina tamponada con fosfato ( <i>Phosphate Buffer Saline</i> )
PKG	Proteína quinasa G ( <i>Protein Kinase G</i> )
PI3K	Fosfatidil inositol 3 quinasa ( <i>Phosphatidil Inositol 3-Phosphate</i> )
PINCH	Proteína rica en cisteína-histidina particularmente interesante ( <i>Particularly Interesting New Cysteine-Histidine-rich Protein</i> )
PIP3	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato ( <i>Phosphatidylinositol 3,4,5-triPhosphate</i> )
PTEN	Fosfatasa supresora de tumores ( <i>Phosphatase and Tensin Homologue Deleted on the Chromosome 10</i> )
RIA	Radioinmunoensayo ( <i>RadioImmunoAssay</i> )
rpm	Revoluciones por minuto

Ser	Serina
Smad	<b>S</b> mall <b>M</b> others <b>A</b> gainst <b>D</b> ecapentaplegic
sGC	Guanilato ciclasa soluble ( <i>soluble Guanylate Cyclase</i> )
SNP	Nitroprusiato sódico ( <b>S</b> odium <b>N</b> itro <b>P</b> ruside)
t	Tiempo
TBS	Solución salina tamponada con Tris ( <b>T</b> ris <b>B</b> uffer <b>S</b> aline)
TGF $\beta$ -1	Factor de crecimiento transformante $\beta$ -1 ( <b>T</b> ransforming <b>G</b> rowth <b>F</b> actor $\beta$ -1).
TIMPs	Inhibidores tisulares de MMPs ( <b>T</b> issue <b>I</b> nhibitors of <b>M</b> etallo <b>P</b> roteinases)
TX	Tamoxifeno
VASP	<b>V</b> Asodilator- <b>S</b> timulated <b>P</b> hosphoprotein
VH	Vehículo





---

## Introducción

Un tejido es un conjunto de células similares que suelen tener un origen embrionario común y que funcionan en asociación para desarrollar actividades especializadas. Los tejidos están formados por células y la matriz extracelular producida por ellas. La matriz es casi inexistente en algunos tejidos, mientras que en otros es abundante y contiene estructuras y moléculas importantes desde el punto de vista estructural y funcional.

La formación y composición de tejidos, bien sea durante el desarrollo normal o como consecuencia del mecanismo de reparación tras un daño, depende de manera crucial del balance entre proliferación y muerte celular, de la migración de las células, de las comunicaciones entre las mismas y de la interacción de la célula con la matriz. Las células normalmente migran creando y deshaciendo las adhesiones, de las células entre sí o con la matriz, y formando conexiones con el citoesqueleto que generan las fuerzas contráctiles requeridas para el movimiento (Vespa et al., 2005).

La comunicación, por tanto, entre el interior y el exterior celular resulta

necesaria para que un tejido se desarrolle, funcione con normalidad y responda a un daño. En la actualidad, se conocen una serie de mecanismos implicados en la comunicación que se establece a través de una compleja red de moléculas, capaces de transducir las señales y conducir la información en ambos sentidos, aunque el flujo hacia el interior celular ha sido más estudiado que el generado hacia fuera (Yoganathan et al., 2000).

El origen, en parte, de este flujo de información se debe a proteínas transmembrana de la superficie celular, como las integrinas, que al carecer de actividad enzimática reclutan adaptadores y proteínas de señalización para mediar sus funciones (Böttcher, 2009). Así comienzan la señal en el citoplasma celular y desencadenan una, o más frecuentemente, varias cascadas de señalización intracelular.

Destaca en esta red de transducción de señales, la **quinasa ligada a integrinas (ILK, Integrin-linked Kinase)**. El presente trabajo trata de estudiar el multifacético papel de ILK en el desarrollo y función normal de tejidos, así como en la reparación de los mismos.



## 1. MATRIZ EXTRACELULAR

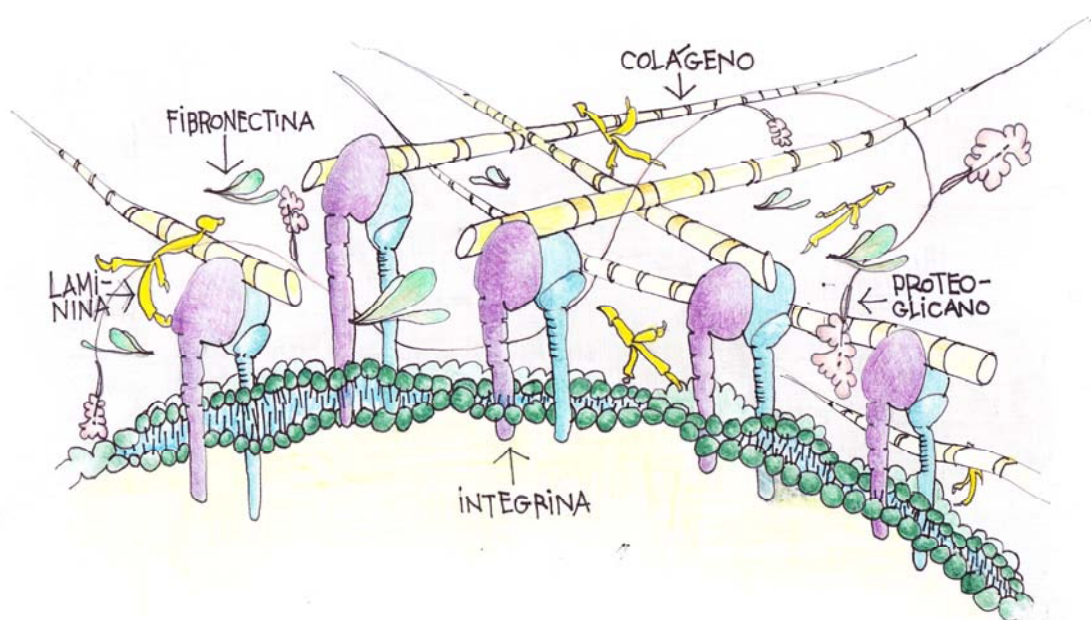
### 1.1 Composición y función

La matriz extracelular (MEC) constituye el soporte biológico de las células y está presente en todos los tejidos y órganos. Es una compleja mezcla de moléculas de matriz, incluyendo glicoproteínas como fibronectina, colágenos, laminina, proteoglicanos y otras proteínas que, sin ser propias de la matriz como son los factores de crecimiento (Berrier and Yamada, 2007), constituyen el entorno donde la célula va a sobrevivir, se va a multiplicar y va a desarrollar sus funciones (Figura 1). Estas macromoléculas

se ensamblan, formando un armazón que determinará la estructura del órgano o tejido, servirá de soporte para la adhesión y migración celular y además, proporcionará a las células información sobre su entorno regulando también procesos de supervivencia, proliferación y diferenciación (Boudreau and Jones, 1999).

### 1.2. Mecanismos de síntesis y degradación

La MEC es un sistema dinámico sometido a un constante recambio de sus componentes, que se realiza manteniendo un estricto balance entre la síntesis y la degradación de los mismos. Este proceso



**Figura 1. Componentes de la matriz extracelular (MEC).** Los principales componentes la MEC son colágeno, fibronectina, laminina y proteoglicanos. Las integrinas unen la célula a la MEC y anclan el citoesqueleto a la membrana plasmática, mediando la señalización *inside-out*.

está gobernado por distintos factores de crecimiento entre los que destaca el factor de crecimiento transformante  $\beta$ -1 (TGF $\beta$ -1, *Transforming Growth Factor*  $\beta$ -1).

TGF $\beta$ -1 es un regulador multifuncional de la proliferación celular y la diferenciación, que contribuye a la acumulación de las proteínas de la MEC al estimular su síntesis y/o disminuir la actividad de algunas proteasas extracelulares (MacKay et al., 1989; Massague et al., 1990). Se expresa, entre otros tipos celulares, en fibroblastos, células musculares lisas y células mesangiales, donde inhibe el crecimiento y estimula la síntesis de colágenos, fibronectina, laminina y proteoglicanos (Marti et al., 1994; Schöklmann et al., 2000; Woolf et al., 1992; Yang et al., 1997). TGF $\beta$ -1 juega un papel crucial en la patogénesis de la esclerosis glomerular y la fibrosis intersticial (Persad et al., 2000) y ha sido implicado en enfermedades cardiovasculares como hipertensión, reestenosis, aterosclerosis, hipertrofia cardíaca e insuficiencia cardíaca (Saura et al., 2005; Ruiz-Ortega et al., 2007). TGF $\beta$ -1 se sintetiza como una proteína inactiva llamada TGF $\beta$ -latente unido a un “péptido asociado a latencia” (LAP, *Latency-associated Peptide*) que lo ancla a la matriz extracelular. Posteriormente se activa por

corte proteolítico. Los mecanismos que regulan su síntesis no se conocen con precisión, pero se sabe que diversos factores implicados en la generación de daño cardiovascular regulan su síntesis. En células musculares lisas es estimulado por angiotensina II (AII), por metaloproteinasa-2 (MMP-2), lipoproteínas de baja densidad oxidadas (LDL oxidadas) o endotelina 1 (ET-1) (Singh et al., 1999; Nakhjavani et al., 2009). En células masangiales su síntesis está regulada por radicales libres y por las propias proteínas de la MEC como el colágeno I y la fibronectina (Iglesias-De la Cruz et al., 2001; Ortega-Velázquez et al., 2004; Dallas et al., 2005). En este sentido recientemente se ha implicado a ILK en la modulación de la expresión de TGF $\beta$  y su función (Ortega-Velázquez et al., 2004; Li et al., 2009).

Los mecanismos de respuesta celular a TGF $\beta$  son complejos, pero la vía de señalización más estudiada, y la implicada en gran parte en la síntesis de proteínas de matriz, es la constituida por las proteínas Smad (*Small Mothers Against Decapentaplegic*). Existen tres tipos de proteínas Smads, las reguladas por el receptor (RSmad, *Receptor-Regulated Smad*), la co-activadora (Co-Smad) y las que tienen función inhibitoria (I-Smad, *Inhibitory Smad*). El TGF $\beta$  se une a



receptores serina/treonina quinasa de tipo II y de tipo I formando un complejo estable, donde los receptores tipo II fosforilan los tipo I y se produce la activación del sistema. El receptor tipo I activado fosforila a las R-Smads, Smad2 y/o Smad3 que, cuando están activados, se unen a Smad4, la coactivadora, y forman un complejo que se transloca al núcleo y regula la transcripción de genes (Massague and Chen, 2000). De esta manera, Smad2 y Smad3 en cooperación con Smad4 funcionan como reguladores de la transcripción inducida por TGF $\beta$ . La función de las I-Smad, Smad-6 y Smad-7, es evitar la fosforilación de las R-Smad por los receptores de TGF $\beta$ , compitiendo por la unión a estos con las R-Smads y reclutando distintas proteínas encargadas de la ubiquitinización de los receptores para su degradación por el proteasoma o fosfatasa que producen su desactivación (Feng and Derynck 2009).

Como se ha mencionado, el constante recambio de los componentes de la MEC se mantiene debido a un estricto balance entre la síntesis y degradación de sus componentes. Entre las proteínas que regulan este balance se encuentran, además del TGF $\beta$ , las metaloproteasas de matriz (MMPs, *Matrix Metalloproteinases*). El TGF $\beta$  además de estimular la síntesis de

nuevos componentes de la MEC, estimula la degradación de las proteínas existentes mediante la activación de las MMPs y la inhibición de los inhibidores tisulares de MMPs (TIMPs, *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*) (Clouthier et al., 1997; Gaudie et al., 2007). Las MMPs son endopeptidasas dependientes de zinc y tienen la función de degradar los componentes de la MEC (Mott and Werb, 2004). Están sometidas a una estricta regulación a varios niveles, el transcripcional, de activación extracelular de las proenzimas que las activan, inhibición de las MMPs ya existentes y secreción TIMPs (Brew et al, 2000). Esta regulación es fundamental para el mantenimiento de la homeostasis y la remodelación de los tejidos. Algunas MMPs son inducidas por estímulos como las especies reactivas del oxígeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*), citoquinas inflamatorias o el óxido nítrico (NO, *Nitric Oxide*) (Siwik and Colucci, 2004; Zaragoza et al, 2002). Además de en el crecimiento y el remodelado tisular, las MMPs están implicadas en situaciones patológicas como en la fibrosis de tejidos, inflamación, cáncer o enfermedades cardiovasculares como la aterosclerosis (Galis and Khatri, 2002).

2. INTERACCIONES CÉLULA-MATRIZ EXTRACELULAR. INTEGRINAS

La adhesión celular a la MEC se realiza a través de distintas proteínas transmembrana. Las más estudiadas y conocidas son las integrinas, pero desde hace algunos años se han descrito otras proteínas, conocidas como proteínas con dominios discoidina (DDR, *Discoidin Domain Receptor*), cuyo papel en la interacción célula-matriz está empezando a ser estudiado (Heino et al, 2009).

Las integrinas, las mejor conocidas de estas proteínas de anclaje, son una familia de proteínas transmembrana que unen la célula a la MEC o a otras células y anclan el citoesqueleto a la membrana plasmática (Hynes, 1992), mediando además en la transducción de señales entre los compartimentos intra y extracelular (Wu and Dedhar, 2001).

2.1. Tipos y funciones

Las integrinas son proteínas heterodiméricas constituidas por dos cadenas polipeptídicas  $\alpha$  y  $\beta$ . Cada subunidad está compuesta por tres dominios, el extracelular, por el que se unen a la MEC, el transmembrana y el intracelular o citoplasmático por el cual

contactan con el citoesqueleto de actina (Figura 2). Se han descrito en el genoma



Figura 2. Estructura básica de la integrina. Proteína receptora de la superficie celular. Cada subunidad está compuesta por el dominio extracelular, el dominio transmembrana y el intracelular.

humano veinticuatro subunidades  $\alpha$  y nueve subunidades  $\beta$  que se combinan dando lugar a 24 integrinas funcionales distintas, que presentan una especificidad relativa en la interacción con sus ligandos y en los mecanismos de señalización (Danen and Yamada, 2001). Consideradas inicialmente como proteínas de anclaje, se ha ido reconociendo su papel como reguladoras de la función celular. Numerosos estudios reflejan cómo las interacciones célula-MEC son esenciales para la supervivencia celular. La pérdida de estas interacciones resulta en la inducción de apoptosis en células epiteliales y endoteliales (Meredith et al., 1993) y en el paro de los fibroblastos en la fase G1 del

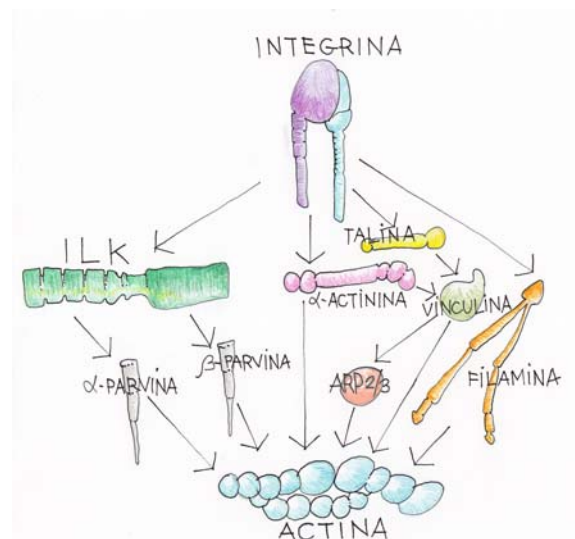


ciclo celular (Guadagno et al., 1993). Se ha demostrado que la interacción de las integrinas es requerida para la supresión de la apoptosis (Boudreau et al., 1995) y también para el tránsito celular de la fase  $G_1 \rightarrow S$  del ciclo celular.

## 2.2. Complejos de adhesión focal y unión al citoesqueleto

La unión del ligando a las integrinas produce su activación y comienza así el reclutamiento de proteínas de señalización y de filamentos de actina al dominio citoplasmático de éstas (Hynes, 2002). Estas especializadas organelas de unión a la MEC y regiones de señalización se denominan complejos focales cuando están en el proceso de formarse, o adhesiones focales cuando ya han madurado en grandes complejos (Brakebusch and Fässler, 2003). En las adhesiones focales se acumulan varios tipos de proteínas celulares y va a tener lugar la interacción de las integrinas con los componentes del citoesqueleto de actina (Romer et al., 2006). La formación de estos complejos asegura la adhesión del sustrato así como la localización dirigida de los filamentos de actina y demás componentes de señalización, y esto es esencial para establecer la polaridad celular, la migración dirigida de la célula y mantener el

crecimiento celular y la supervivencia. Las integrinas parecen intervenir además en el reclutamiento de receptores de factores de crecimiento a las adhesiones focales, lo cual conduce a su fosforilación y activación aumentando la respuesta a estos factores de crecimiento (Miyamoto et al., 1996). Por otro lado, la unión de los factores de crecimiento a sus receptores también puede modificar la función de las integrinas alterando su estado de afinidad y avidéz por sus ligandos. ILK, a través de su dominio quinasa, tiene un papel fundamental en la maduración de las adhesiones focales (Stanchi et al., 2009). Otras proteínas como talina, filamina,  $\alpha$ -actinina, vinculina, paxilina o parvina (Figura 3), con múltiples dominios que forman parte de las adhesiones focales,



**Figura 3. Interacciones de Integrinas.** Vista de las distintas vías por las que integrinas pueden unirse al citoesqueleto de actina.

van a jugar un papel crucial en la interacción integrina-actina (Liu et al., 2000; Brakebusch and Fässler, 2003).

Existen trabajos recientes que han revelado que la conexión citoesqueleto de actina-integrina es muy dinámica y está sujeta a muchos procesos de regulación. Por ejemplo en experimentos de herida en piel, las integrinas promueven la reorganización del citoesqueleto de queratinocitos en los márgenes de la herida, dando así lugar a una migración dirigida y al consecuente cierre de la herida. La pérdida de integrinas  $\beta_1$  en los queratinocitos da lugar a una defectuosa y no dirigida migración, resultando en una tardía reepitelización (Grose et al., 2002). Más allá de esto, se ha comprobado que la interacción entre integrinas y el citoesqueleto de actina se regula de manera diferente dependiendo de la zona de la célula que nos encontremos. En el borde principal de la célula en migración, las integrinas se unen a la MEC, reclutan al citoesqueleto de actina e inician la reorganización local de la red de actina. En la parte trasera de la célula, las integrinas se desprenden de la MEC interrumpiendo la unión al citoesqueleto y son, al menos parcialmente, reclutadas al frente de la célula (Ballestrem et al., 2001; Laukaitis et al., 2001).

### 3. TRANSMISIÓN DE LAS SEÑALES INSIDE-OUT Y OUTSIDE-IN

La señalización mediada por integrinas transmite señales a través de la membrana de forma bidireccional, es decir, desde la MEC al citoplasma y también al revés, en un proceso conocido como señalización *inside-out* y *outside-in* (Hynes, 2002).

#### 3.1. Señalización *inside-out*

En respuesta a señales citoplasmáticas iniciadas por otros receptores celulares (O'Toole et al., 1991), la célula puede modificar la afinidad de las integrinas por sus ligandos o alterar la expresión de las distintas integrinas sobre la superficie celular. A través de estos mecanismos la célula modifica su comportamiento en cuanto a la adhesión o la migración, por ejemplo.

La señalización *inside-out* implica un cambio conformacional desde el dominio citoplasmático de las integrinas hasta el sitio de unión extracelular en respuesta a la señalización intracelular (O'Toole et al., 1991; O'Toole et al., 1994). La base molecular de estos cambios conformacionales es compleja. Se han identificado regiones dentro del dominio



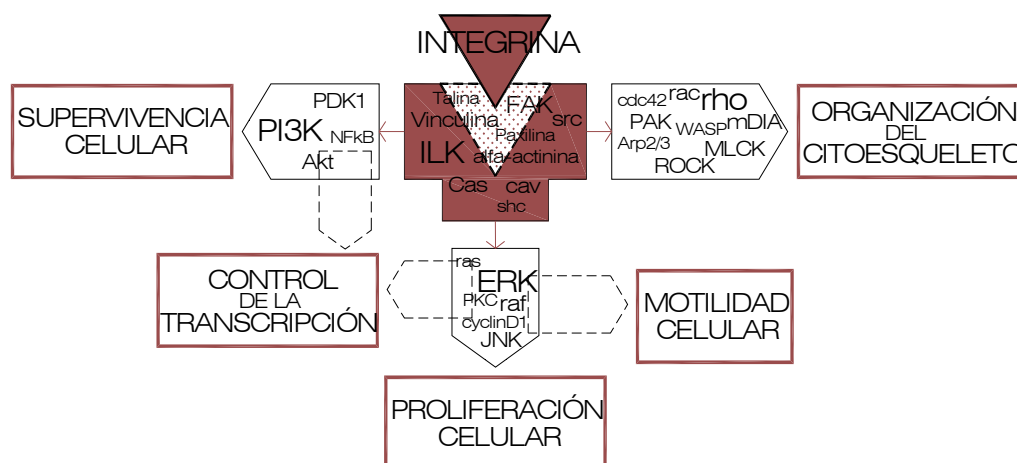


citoplasmático de las integrinas que podrían estar implicados en la regulación de esta señalización. Además, existen proteínas citoplasmáticas que también están involucradas como calreticulina, serina/treonina quinasas y fosfatasa, así como miembros de la familia de las GTPasas como R-Ras y Rho A (Dedhar and Hannigan, 1996) y proteínas de adhesión focal como talina (Anthis et al., 2009). ILK contribuye al *inside-out* de la activación de integrinas (Honda et al., 2009).

### 3.2. Señalización *outside-in*

La interacción de las células con la MEC regula procesos celulares fundamentales como supervivencia celular, proliferación, diferenciación, morfogénesis y migración celular. Las integrinas van a

interaccionar, a través de su dominio citoplasmático y en respuesta a la unión del ligando, con diversas proteínas con actividad quinasa entre las que destacan la quinasa de adhesión focal (FAK, *Focal Adhesion Kinase*) e ILK. Estas quinasas se encargan de reclutar y fosforilar proteínas señalizadoras y adaptadoras que conducen sus señales al citoesqueleto. Las integrinas pueden influenciar otras cascadas de señalización intracelular que dependen de PI3K, Akt/PKB, Raf, la familia de Rho GTPasas o las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs, *Mitogen-activated Protein Kinases*). Estas proteínas activan o inhiben distintas vías de señalización en respuesta a los estímulos recibidos de la MEC a través de las integrinas (Zamir and Geiger, 2001) (Figura 4).



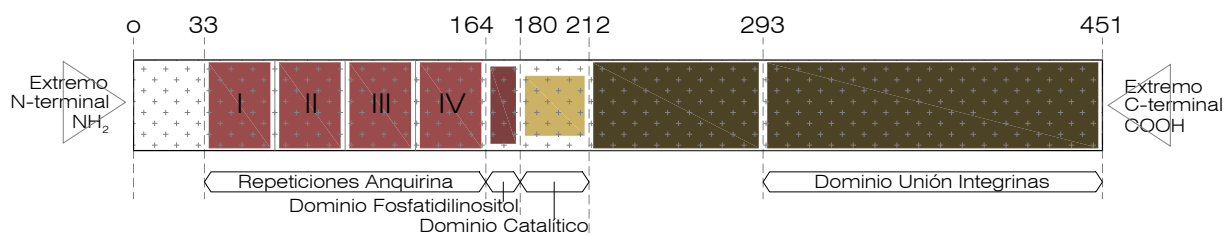
**Figura 4. Vía señalización de integrinas.** A través de la interacción con diferentes proteínas citoplasmáticas, las integrinas desencadenan múltiples vías de señalización que conducen a la organización del citoesqueleto, la motilidad celular, la proliferación, el control de transcripción y la supervivencia celular.

4. QUINASA LIGADA A INTEGRINAS (ILK)

La quinasa ligada a integrinas (ILK) fue identificada, en la búsqueda de proteínas capaces de interactuar con el dominio citoplasmático de la subunidad  $\beta 1$  de ciertas integrinas, como una serina/treonina quinasa de 59 kDa (Hannigan et al., 1996). Se encuentra formando parte de las adhesiones focales y, por tanto, está involucrada en la transducción de señales y en la adhesión de las células a la matriz extracelular (Wu, 2001), regulando procesos como crecimiento, proliferación, supervivencia, diferenciación, migración, invasión y angiogénesis (Hannigan et al., 2005; Legate et al., 2006).

4.1. Estructura

ILK se compone de tres dominios diferenciados. En el extremo C-terminal se encuentra el dominio catalítico, con actividad quinasa y capacidad para interactuar con varias proteínas. El extremo N-terminal está compuesto por cuatro repeticiones de anquirina y, entre estos dos dominios, solapándose parcialmente, hay un dominio putativo de homología a plecstrina (PH, *Pleckstrin Homology*) cuyo ligando fisiológico es el fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP<sub>3</sub>, *Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate*) (Boulter and Van Obberghen-Schilling, 2006) (Figura 5).



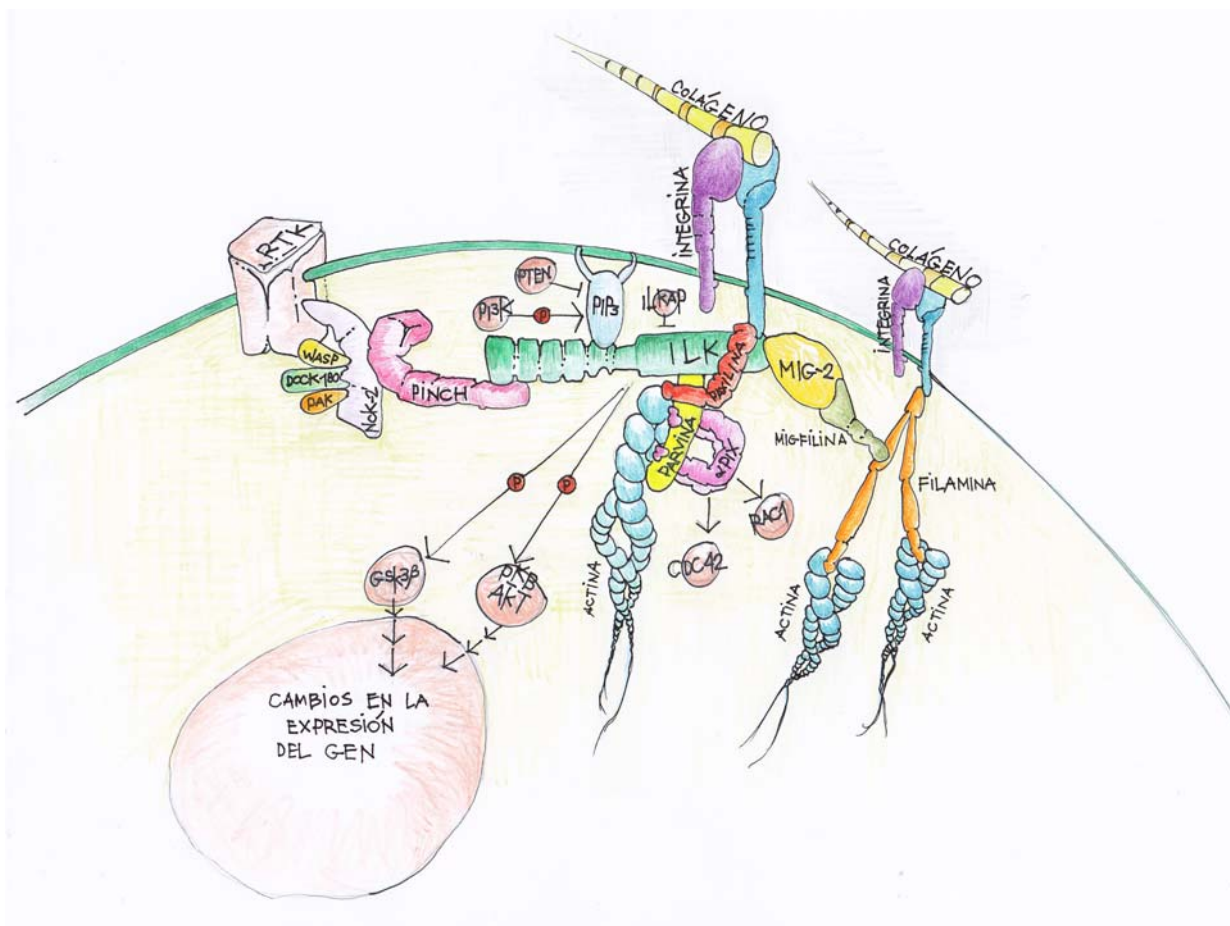
**Figura 5. Dominios funcionales de la quinasa ligada a integrinas (ILK).** ILK es una serina/treonina proteína quinasa con un dominio catalítico con actividad quinasa en el extremo C-terminal, extremo donde se encuentra el sitio de unión a integrinas (residuos 293-451). En el otro extremo, el N-terminal se encuentran las cuatro repeticiones anquirina (residuos 33-164), el dominio fosfatidilinositol comienza en el último de los dominios anquirina y llega hasta el dominio catalítico (residuos 180-212).



#### 4.2. Plataforma de conexión

A lo largo de los tres dominios que forman la estructura de ILK se encuentran los puntos de anclaje a diversas proteínas que hacen que ILK se integre en un complejo multiproteico y multifuncional (Figura 6). Estas proteínas facilitan su localización en las adhesiones focales y coordinan la organización del citoesqueleto (Wu, 2004).

En el extremo N-terminal se encuentran las cuatro repeticiones de anquirina que son esenciales para que ILK se una a la proteína rica en cisteína-histidina particularmente interesante (PINCH, *Particularly Interesting New Cysteine-histidine-rich Protein*) (Rearden, 1994; Tu et al., 1999) y a la proteína asociada a ILK (ILKAP, *ILK-associated Phosphatase Protein*) perteneciente a la familia de las fosfatasa PP2C. Las dos isoformas PINCH1 y PINCH2 se componen



**Figura 6. Plataforma de conexión de ILK.** ILK se une a PINCH y Parvina formando un complejo ternario (IPP) que interacciona con la membrana plasmática a través de la interacción con el dominio citoplásmico de las integrinas activadas  $\beta_1$  y  $\beta_3$  así como a otros componentes desconocidos de la adhesión focal. La unión con fosfolípidos resulta en la activación de la función quinasa de ILK, que conduce a la fosforilación de GSK3 $\beta$  y PKB/Akt. Además ILK puede reclutar diferentes proteínas adaptadoras, que son capaces de regular los movimientos y adhesión de la actina a las adhesiones focales.

de cinco dominios LIM. Por el primero de sus dominios LIM1 se une a ILK (Tu et al., 1999) y es esencial para dirigir a PINCH a los sitios de contacto célula-matriz (Zhang et al., 2002), estabilizar la expresión de ILK y regular la forma y supervivencia celular (Xu et al., 2005). El cuarto dominio de PINCH, LIM4, interacciona con la proteína adaptadora Nck-2 (Tu et al., 1998). Nck-2 puede unirse, a través del dominio SH2, a residuos tirosina fosforilados de receptores tirosina quinasas como son el receptor del factor de crecimiento epitelial (EGFR, *Epidermal Growth Factor Receptor*) o el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR, *Platelet-derived Growth Factor Receptor*) y de esta manera involucrarse en la señalización de factores de crecimiento e integrinas. Además, Nck-2, a través de su dominio SH3, va a ser capaz de reclutar proteínas reguladoras de actina, como WASp (*Wiskott-Aldrich Syndrome Protein*), DOCK180 (*180 kDa Protein*) y PAK (*p21-activated Kinase*), otorgándole un papel en la mecánica y reorganización de la actina (Brakebusch and Fässler, 2003).

El dominio central PH (*Pleckstrin Homology*) es activado por PIP<sub>3</sub> en células epiteliales de intestino de rata (Delcommenne et al., 1998), siendo por

tanto, la actividad de ILK PI<sub>3</sub> quinasa dependiente.

El dominio quinasa de ILK participa en la interacción de muchas proteínas. Además de la unión a la subunidad  $\beta$ <sub>1</sub> de integrinas, este dominio se une a proteínas que conectan ILK con plataformas de señalización y/o con el citoesqueleto de actina. Se encuentran entre ellas las parvinas, a las que ILK se une a través del segundo dominio de homología a calponina (CH, *Calponin Homology*). Las parvinas están relacionadas con la translocación a membrana y fosforilación de Akt en su serina 473 (Fukuda et al., 2003a) así como la activación de Rac y Cdc42 (Filipenko et al., 2005). Experimentos con ARN de interferencia han revelado que ILK-PINCH-parvinas son mutuamente dependientes: la delección de alguna de ellas induce la degradación, vía proteasoma, de las otras (Fukuda et al., 2003b). Juntas, forman un complejo ternario llamado IPP (ILK-PINCH-Parvin) (Legate et al., 2006).

ILK también se une a paxilina por su primer dominio rico en leucina (LD, *Leucine-rich Domain*) (Nikolopoulos and Turner, 2002). Paxilina es una proteína localizada en las adhesiones focales que integra las señales mediadas por integrinas capaz de



asociarse directamente con PKL (*Paxillin Kinase Linker*) e indirectamente con PAK (*p-21 Activated Protein kinase*) y PIX (*Pix Protein*) (Turner et al., 1999).

Otra proteína a la que ILK se une es Mig-2, el homólogo en mamíferos de la proteína UNC-112 de *C. elegans*. Esta proteína hace de puente en el hueco existente entre ILK y la actina, promoviendo así la reorganización del citoesqueleto (Larjava et al., 2008).

Por último, se ha encontrado ILK en complejos que contienen otras proteínas como PKB/Akt y PDK-1 (Persad et al., 2001), caveolina-1 (Meyer et al., 2005) y Hsp90.

Ésta última, como ocurre con otras proteínas, estabiliza a ILK impidiendo su degradación por el proteasoma (Aoyagi et al., 2005).

#### 4.3. Señalización

ILK también participa en vías de señalización que controlan supervivencia celular, diferenciación, proliferación y expresión génica (Wu, 2001) (Figura 7), regulando la transmisión de la señal de las integrinas al modular, directa o indirectamente, la fosforilación de la serina del dominio citoplasmático de integrinas  $\beta 1$  (Mulrooney et al., 2000).

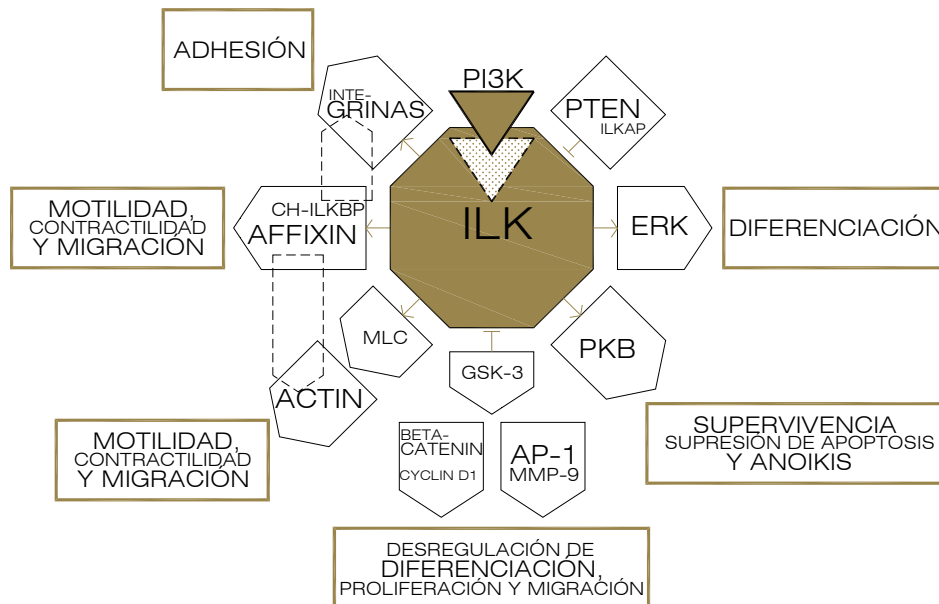


Figura 7. Vías de señalización de ILK. Procesos celulares en los que participa ILK al interactuar con las distintas moléculas de señalización.

ILK tiene una actividad quinasa basal baja y es estimulada transitoriamente por interacciones célula-MEC, así como por ciertos factores de crecimiento (Dedhar, 2000). La actividad de ILK es regulada de forma negativa por ILKAP y por la fosfatasa supresora de tumores (PTEN, *Phosphatase and Tensin Homologue Deleted on the Chromosome 10*). ILK se encuentra constitutivamente activa en tumores con ausencia de PTEN (Leung-Hagesteijn et al., 2001; Persad et al., 2000; Morimoto et al., 2000).

Aunque ILK carece de las secuencias consensos cruciales de las serina-treonina quinasas, se ha descrito como una pseudoquinasa que fosforila la proteína quinasa B (Akt; también conocida como PKB, *Protein Kinase B*), la glicógeno quinasa sintasa-3 (GSK, *Glycogen Synthase Kinase-3*), y la cadena ligera de miosina (MLC, *Myosin Light Chain*) (Wu and Dedhar 2001).

Akt regula la supervivencia celular y la apoptosis. Para llegar a estar totalmente activada requiere ser fosforilada en dos aminoácidos, en la treonina 308 a través de la quinasa 3-fosfoinositol dependiente (PDK1, *PI 3-kinase-dependent Kinase-1*), mientras que la fosforilación en la serina 473 depende de la actividad PI3K (Persad

et al., 2001) y de mTOR (*Mammalian Target of Rapamycin*) (Sarbasov et al., 2005). ILK interacciona con rictor, componente de mTOR y ambos son requeridos para la fosforilación de Akt en la serina 473 (McDonald et al., 2008).

Como consecuencia de la activación constitutiva o de la sobreexpresión de ILK se suprime la anoikis y la apoptosis (Attwell et al., 2000; Benoit et al., 2007). Estos dos efectos implican la activación de Akt y la supresión de la activación de caspasa-3 mediada por ILK. La regulación de Akt por ILK depende del tejido y del tipo celular (Hannigan et al., 2005; Troussard et al., 2006). Así, condrocitos y fibroblastos aislados de ratones deficientes en ILK muestran fosforilación de Akt en la serina 473 (Grashoff et al., 2003; Sakai et al., 2003). La mayoría de los experimentos donde se ha demostrado la fosforilación de Akt mediada por ILK se han realizado en células cancerígenas, por lo que se ha sugerido que la activación de Akt es más dependiente de ILK en tumores (Wu, 2004).

La segunda diana de ILK, GSK  $\beta$ , es fosforilada en la serina 9 e inactivada y está involucrada en la regulación del ciclo celular a través de la proteólisis de la ciclina D1 y la activación del factor de



transcripción AP-1 (Diehl et al., 1998; Troussard et al., 1999). La inactivación de GSK3 $\beta$  contribuye a la estabilización de la  $\beta$ -catenina, cuya acumulación está relacionada con la desregulación de los procesos de proliferación, diferenciación y migración (Attwell et al., 2000, Oloumi et al., 2004). ILK además puede regular directamente la expresión de la ciclina D1: la translocación de  $\beta$ -catenina al núcleo es estimulada por ILK y eso lleva a la activación transcripcional de ciclina D1 a través de Lef/Tcf (*Lymphoid Enhancer Factor/T Cell Factor*) (Novak et al., 1998). ILK también regula la expresión de la proteína de adhesión epitelial E-caderina al disminuir la actividad de su promotor en células humanas de carcinoma de colon (Tan et al., 2001).

ILK también fosforila directamente la MLC, en la serina 18/treonina 19 de forma independiente de calcio, por lo que podría influir en la contracción de las células musculares lisas, en la motilidad de células no musculares o en la migración celular (Deng et al., 2001).

Existen otras vías en las que ILK parece también influir activamente. En la diferenciación muscular ILK tiene un papel regulador al activar Erk (*Extracellular Signal-regulated Kinase*), que actúa suprimiendo

factores de transcripción requeridos para la diferenciación miogénica (Huang et al., 2000). También actúa en la diferenciación y control del desarrollo de las células epiteliales mamarias (Akhtar et al., 2009).

ILK, por tanto, puede controlar la actividad de varias vías de señalización, al llevar a cabo la estimulación de quinasas y de factores de transcripción, que activan o inhiben la expresión de genes codificadores de proteínas implicadas en la modificación de la supervivencia celular, ciclo celular, adhesión y síntesis de MEC.

## 5. PAPEL FISIOLÓGICO DE ILK EN EL DESARROLLO NORMAL DE TEJIDOS

Utilizando estrategias que implican la pérdida de la expresión y actividad de ILK se ha demostrado el importante papel que tiene en multitud de procesos fisiológicos que contribuyen al desarrollo normal de distintos tejidos y a su correcto funcionamiento.

Se ha observado que la deficiencia de ILK resulta letal en la etapa embrionaria en *Xenopus laevis* (Yasunaga et al., 2005) y en el ratón (Sakai et al., 2003), un fenómeno atribuido a defectos en los mecanismos de adhesión y migración. En el pez cebra también se ha observado letalidad embrionaria por fallo cardíaco al estar interrumpida la unión de ILK a parvina, y reducirse la actividad quinasa de ILK (Bendig et al., 2006). Todos estos descubrimientos proveen evidencias de la necesidad fisiológica de ILK y de su actividad quinasa (Tabla 1). Se ha demostrado recientemente, sin embargo, que la actividad quinasa de ILK no es indispensable para el desarrollo o supervivencia postnatal de mamíferos, sino que es la interacción entre ILK y  $\alpha$ -parvina lo que resulta crítico para la correcta morfogénesis del riñón (Lange et al., 2009).

Por otro lado, la delección de ILK compromete el desarrollo normal de tejidos. En condrocitos produce defectos esqueléticos y en las células endoteliales produce deficiencias en el desarrollo vascular (Terpstra et al., 2003; Friedrich et al., 2004). En macrófagos inmortalizados disminuye la fosforilación de Akt/PKB y GSK-3 $\beta$ , mientras que no se han observado cambios en los niveles de fosforilación de estas proteínas en fibroblastos deficientes en ILK. Estas discrepancias pueden deberse a diferencias específicas del tipo celular o a un aumento de la dependencia de la actividad quinasa en células inmortalizadas (Sakai et al., 2003; Troussard et al., 2003). También se ha observado que su delección en células epiteliales mamarias lleva a un fallo en la lactogénesis (Akhtar et al., 2009).

La sobreexpresión de ILK o su activación constitutiva produce la transformación de líneas celulares en oncogénicas y la formación de tumores en modelos de ratones transgénicos suprimiendo la apoptosis en estos casos (Attwell et al., 2000) y aumentando la fosforilación de PKB/Akt, GSK-3 $\beta$  y MAPKs en otros (White et al., 2001). Se ha descrito un aumento de la actividad o de la expresión de ILK en tumores avanzados de próstata y en cáncer colorectal (Graff et al.,





2001; Marotta et al., 2001). En otros casos su sobreexpresión mejora el remodelado y función cardíaca en ratas que han sufrido un infarto de miocardio, debido a un

aumento de la proliferación de miocardiocitos y angiogénesis y una reducción en la apoptosis (Ding et al., 2009).

**Tabla 1. Funciones de ILK en el tejido normal**

TEJIDO	FUNCIÓN OBSERVADA DE ILK	IMPLICACIÓN PATOLÓGICA DEL KNOCK-OUT DE ILK	REFERENCIAS
Hueso (condrocitos)	Proliferación y adhesión	Enanismo	(Grashoff et al., 2003; Terpstra et al., 2003)
Piel (queratinocitos)	Proliferación; adhesión y migración	Malformación piel, inhibición del desarrollo del folículo piloso	(Lorenz et al., 2007; Nakrieko et al., 2008)
Músculo esquelético	Adhesión y diferenciación de mioblastos	Distrofia muscular	(Gheyara et al., 2007; Huang et al., 2000; Mackinnon et al., 2002; Miller et al., 2003; Postel et al., 2008; Wang et al., 2008; White et al., 2006; Zervas et al., 2001)
Músculo liso	Contractilidad; Adhesión y dinámica del citoesqueleto	Desconocido	(Deng et al., 2001; Deng et al., 2002; Erdodi et al., 2003; Huang et al., 2006; Muranyi et al., 2002; Zhang et al., 2007)
Riñón (células tubulares epiteliales y podocitos)	Transición epitelio mesénquima; Adhesión	Fibrosis, proteinuria	(Dai et al., 2006; El-Aouni et al., 2006; Kanasaki et al., 2008)
Hígado (hepatocitos)	Diferenciación; supervivencia	Hepatitis	(Gkretsi et al., 2007a; Gkretsi et al., 2007b)
Sistema nervioso central (neuronas)	Adhesión; migración y polaridad; proliferación y supervivencia	Lisencefalia de Cobblestone	(Belvindrah et al., 2006; Gary et al., 2003; Guo et al., 2007; Mills et al., 2003; Mills et al., 2006; Naska et al., 2006; Niewmierzycka et al., 2005; Oinuma et al., 2007; Zhou et al., 2004)
Sistema Inmune (células T, macrófagos)	Supervivencia; adhesión; migración; proliferación	Desconocido	(Chu et al., 2006; Liu et al., 2005; Tan et al., 2002; Troussard et al., 2003)
Sistema cardiovascular (células endoteliales, cardiomiocitos)	Supervivencia; proliferación; migración e invasión	Cardiomiopatía	(Friedrich et al., 2004; Joshi et al., 2007; Tan et al., 2004; Vouret-Craviari et al., 2004; Knoll et al., 2007; White et al., 2006)

## 6. PROCESOS FISIOPATOLÓGICOS EN LOS QUE PARTICIPA ILK

ILK participa también en distintos procesos fisiopatológicos. Se describen a continuación aquellos procesos más relevantes para el trabajo que nos ocupa.

### 6.1. ILK en la estructura y función cardiovascular

La pared vascular está formada por células endoteliales, musculares lisas y fibroblastos, y por componentes no celulares, como la MEC. De forma dinámica estos componentes modifican su forma, aumentan, disminuyen o se reorganizan, en respuesta a estímulos fisiológicos y patológicos, manteniendo así la integridad del vaso y participando en la alteración vascular que aparece en enfermedades como la hipertensión y la aterosclerosis (Touyz, 2000).

Las células endoteliales están implicadas en la homeostasis vascular y en el tráfico celular, regulando el tono vascular, la coagulación sanguínea y las respuestas inmunes e inflamatorias. Los factores que influyen en el balance entre supervivencia celular y muerte de estas células tienen un gran impacto en estos procesos biológicos (Chavakis et al., 2002; Hanahan et al., 1996; Stupack et al., 2002).

Se ha observado que la delección de ILK en el endotelio de ratones resulta en defectos en vascularización y letalidad embrionaria, además de en un incremento de la apoptosis de la célula endotelial y reorganización del citoesqueleto, demostrando así que juega un papel fundamental en el desarrollo vascular y en la supervivencia de la célula endotelial (Friedrich et al., 2004). Otros experimentos en los que se ha bloqueado la expresión de ILK a través de su ARN de interferencia, han puesto en evidencia una acumulación de células en la fase G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> y una marcada disminución en el número de células que se encuentran en la fase S, así como en la expresión de la ciclina D1. Además, estas células encuentran disminuída su capacidad de migración y de formación del vaso (Guo et al., 2009).

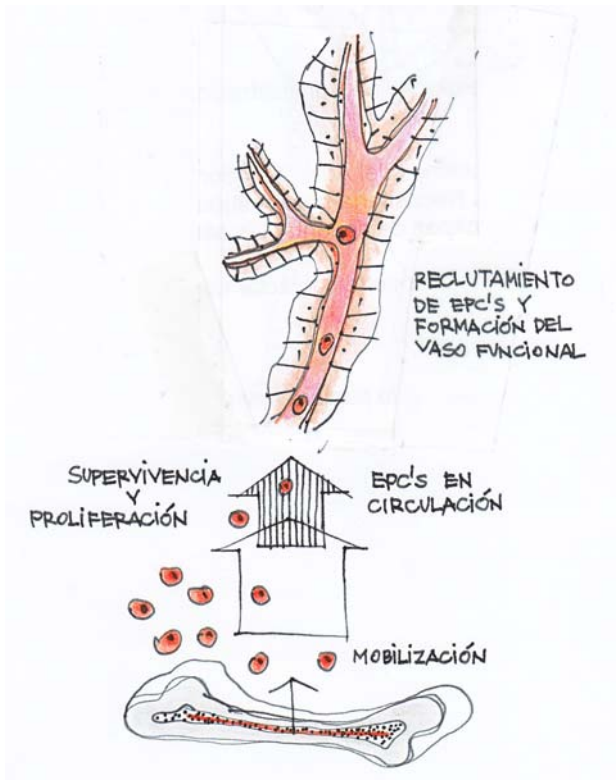
La disfunción endotelial sin muerte celular manifiesta es un fenómeno que se observa en los inicios de la enfermedad vascular y constituye un paso desencadenante de condiciones patológicas como la aterosclerosis o la hipertensión (Gimbrone et al., 1999). ILK parece estar también implicada en el mantenimiento del tono vascular y de la perfusión tisular, ya que se ha visto que las células endoteliales de cordón umbilical sembradas sobre COL I sintetizan menos



NO que las que crecen en COL IV, probablemente como consecuencia de una disminución en la expresión del mensajero de eNOS. Esta disminución parece ser dependiente de la actividad de ILK (González-Santiago et al., 2002). Por otro lado, avances recientes en la fisiología cardíaca identifican a ILK como una molécula esencial en la regulación del crecimiento, contractilidad y reparación cardíaca. Los modelos animales de ILK y de proteínas asociadas como parvinas o PINCH han sido de gran ayuda para elucidar estas funciones y han establecido claramente que ILK es crítica para el normal funcionamiento del corazón. Aunque ILK se expresa en gran cantidad de tejidos, es en el corazón donde lo hace con mayor intensidad. Su supresión dirigida en este órgano produce la disgregación de los cardiomiocitos y la ruptura de la señalización mediada por las adhesiones focales, conduciendo a una cardiomiopatía espontánea y fallo cardíaco en ratones, asociado además a una disminución de la fosforilación de Akt/PKB (White et al., 2006). La sobreexpresión específica de ILK en el corazón de ratones transgénicos induce hipertrofia. ILK, además, puede ser importante tras un infarto y en la reparación del miocardio por mediar en la migración celular (Hannigan et al., 2007). La angiogénesis es el proceso fisiológico que consiste en la formación de

vasos sanguíneos nuevos a partir de los vasos preexistentes. La angiogénesis es un fenómeno normal durante el desarrollo embrionario, el crecimiento del organismo y en la cicatrización de las heridas. Sin embargo, también lo es en el proceso fundamental de la transformación maligna del crecimiento tumoral. En estos procesos tienen gran importancia las células endoteliales progenitoras (EPCs, *Endothelial Progenitor Cells*) (Asahara et al., 1997), que en las fases agudas del daño endotelial o en tejidos isquémicos son movilizadas desde la médula ósea a la circulación, llegan al punto de interés y se incorporan en el endotelio y adoptan el fenotipo endotelial mediando la re-endotelización y neovascularización (Aicher et al., 2005; Hristov et al., 2007; Bauersachs et al., 2007) (Figura 8). ILK está involucrada en la formación de vasos durante el desarrollo embrionario (Friedrich et al., 2004), y en el de tumores a través de la regulación del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF, *Vascular Endothelial Growth Factor*) (Tan et al., 2004).

En condiciones de hipoxia, ILK se induce en las células endoteliales, junto con un incremento de expresión de la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1, *Intercellular Adhesion Molecule-1*) y del factor derivado de la célula estromal-1 (SDF-



**Figura 8. Células endoteliales progenitoras (EPCs).** En respuesta a hipoxia las EPCs son reclutadas desde la médula ósea y se movilizan hasta el tejido isquémico para la formación de un nuevo vaso.

1, *Stromal cell-Derivated Factor-1*), participando en el reclutamiento de las EPCs a las áreas isquémicas (Lee et al., 2006). Además, la sobreexpresión de ILK en EPCs les protege ante la falta de anclaje o la privación de nutrientes *in vitro*, e incrementa la neovascularización en el modelo de isquemia (Cho et al., 2005). En la enfermedad arterial coronaria, ILK está disminuída en las EPCs y esto está asociado a defectos migratorios, fenotipo que revierte al sobreexpresar ILK. Las quimioquinas son las responsables de la

activación de ILK en las EPCs (Werner et al., 2008). Por último, Zhang et al. demostraron que las células endoteliales expuestas a LDL oxidadas sobreexpresan ILK y gracias a esa sobreexpresión se protegen de la apoptosis (Zhang et al., 2001).

## 6.2. Remodelado vascular

Muchas de estas enfermedades cardiovasculares como la hipertensión, aterosclerosis, obesidad o diabetes van a cursar con alteraciones de la MEC, produciéndose cambios tanto en su composición como en su funcionalidad. Estas alteraciones conducen a un proceso de remodelado vascular, definido como la capacidad del vaso para reorganizar sus componentes celulares y extracelulares en respuesta a estímulos crónicos (Gibbons et al., 1994).

El remodelado es fundamental para el mantenimiento de la homeostasis y la adaptación de los tejidos y sucede en respuesta a numerosos estímulos, como demandas metabólicas y fuerzas hemodinámicas. De esta forma, por ejemplo, los vasos sanguíneos van a adaptar su diámetro a las variaciones crónicas del flujo de sangre circulante. El remodelado ocurre durante el desarrollo normal, el entrenamiento físico y otras

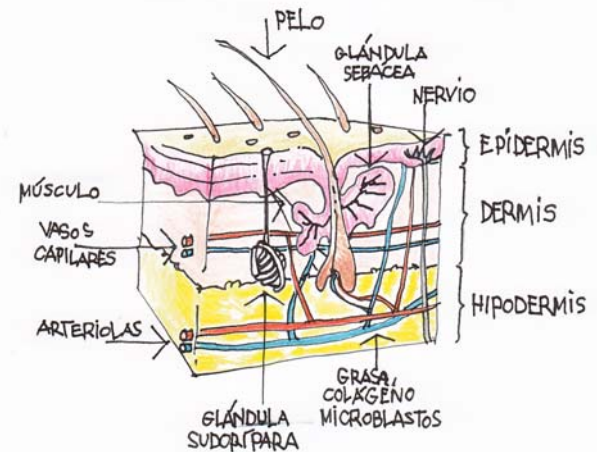


situaciones, para mantener el balance correcto entre las demandas tisulares y el aporte sanguíneo. La reestructuración de las arterias es un proceso dirigido fundamentalmente por la sensibilidad directa de las células vasculares a las fuerzas físicas. Aumentos o disminuciones en las fuerzas de cizalladura o *shear stress* producidos por el flujo sanguíneo a nivel de la superficie endotelial produce un remodelado que incrementa o disminuye el flujo respectivamente (Dajnowiec et al., 2007). El remodelado se denomina positivo cuando se ensancha el diámetro de los vasos, por hiperplasia de la íntima, manteniendo el tamaño del lumen. Este mecanismo, en un principio beneficioso, puede convertirse en perjudicial cuando los mecanismos que lo regulan se descompensan. Se considera negativo cuando la luz del vaso disminuye, por ejemplo por una oclusión de una arteria, produciéndose una disminución en el flujo sanguíneo (Ward et al., 2000). Un proceso de remodelado anormal tiene lugar en muchas patologías cardiovasculares, como reestenosis, aterosclerosis, diabetes o hipertensión (Pasterkamp et al., 2000).

### 6.3. ILK en la estructura y función de la piel

La piel es el órgano más extenso del cuerpo, al que recubre en su totalidad. Una

de sus principales funciones es actuar como un escudo protector contra las lesiones e infecciones. Está formada por tres capas bien diferenciadas, la epidermis, la dermis y la hipodermis, cada una de las cuales desempeña una función (Figura 9).



**Figura 9. Estructura de la piel.** La piel se compone de tres capas, la epidermis que constituye la capa exterior, y que esta compuesta por la córnea formada por células epiteliales endurecidas, la dermis donde se encuentran las glándulas sebáceas y los bulbos capilares sujetos por fibras musculares lisas, y la hipodermis, tejido eminentemente graso donde se encuentran las glándulas sudoríparas.

La epidermis es la delgada capa externa de la piel compuesta a su vez por tres partes. La más externa, el estrato córneo o capa córnea, está formada por queratinocitos completamente maduros que contienen proteínas fibrosas (queratinas). Esta capa se renueva constantemente y previene la entrada de la mayoría de las sustancias extrañas y la pérdida de fluidos corporales. A

continuación se encuentra el estrato escamoso, formado por queratinocitos activos o células escamosas, que maduran y forman el estrato córneo. Y por último la capa basal, la más profunda de la epidermis, que contiene las células basales que se dividen continuamente, formando nuevos queratinocitos que reemplazan a los que se desprenden de la superficie cutánea. Además la epidermis también contiene melanocitos que producen melanina, el pigmento de la piel.

La dermis es la capa media de la piel. En ella se ubican los fibroblastos, que sintetizan el colágeno que confiere su consistencia típica a la piel. En esta capa se encuentran los receptores del dolor y del tacto así como los vasos sanguíneos, linfáticos, los folículos pilosos y las glándulas sudoríparas.

La hipodermis es la capa más profunda de la piel. Está compuesta por una red de colágeno y de grasa, que ayuda a conservar el calor corporal y protege el cuerpo contra lesiones al amortiguar los impactos.

ILK parece jugar un importante papel en la piel. Experimentos realizados en fibroblastos sugieren que es especialmente relevante en la proliferación celular,

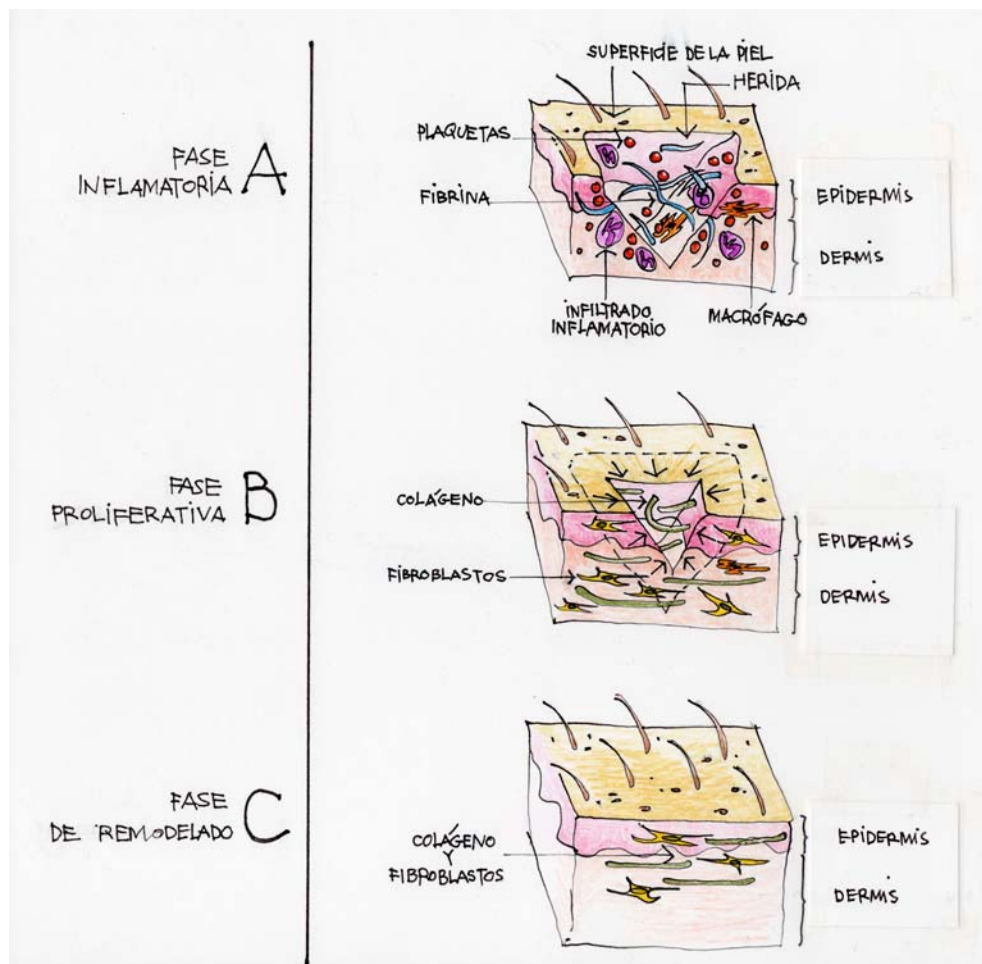
organización del citoesqueleto de actina y formación de los contactos focales (Sakai et al., 2003). La delección de ILK en queratinocitos resulta en defectos en polaridad y en proliferación (Yang et al., 2008). Además en los animales mutados, el desarrollo del folículo piloso está severamente dañado, lo que resulta en una progresiva pérdida del pelo en estos ratones (Lorenz et al., 2007; Nakrieko et al., 2008).

## 7. UN MODELO EXPERIMENTAL DE REPARACIÓN TISULAR: LA HERIDA

Dado el fácil acceso del tejido, la cicatrización de la herida en piel ha sido utilizada como modelo experimental de reparación tisular.

La cicatrización de la herida, o reparación, es un proceso complicado por el que la piel (o cualquier otro órgano) se

repara tras una lesión. En la piel normal, la epidermis y la dermis se encuentran en un estado de equilibrio, formando una barrera protectora contra el medio externo. Cuando esta barrera se rompe, se pone en marcha un proceso dinámico y coordinado llamado cicatrización de la herida, que implica inflamación, proliferación celular, migración, deposición de MEC y remodelado del tejido (Figura 10).



**Figura 10. Etapas del proceso de cicatrización de la herida.** A) Fase inflamatoria: fagocitosis por los macrófagos, infiltración leucocitaria, agregación plaquetaria y formación del tapón de fibrina. B) Fase proliferativa: angiogénesis, deposición de colágeno, proliferación de fibroblastos y contracción de la herida. C) Remodelado: del colágeno, reajuste tensión, apoptosis.

La formación del nuevo tejido comienza con la migración de queratinocitos en la epidermis y en el folículo piloso de la herida (Schäfer and Werner, 2007). En los instantes siguientes a la herida, las plaquetas se agregan en la zona de la herida formando un tapón de fibrina; este tapón actúa controlando la hemostasia. En la fase inflamatoria una gran cantidad de polimorfonucleares llegan a la zona, las bacterias son fagocitadas y eliminadas y se liberan los factores responsables de la migración y división celular implicados en la fase proliferativa.

La segunda fase, la proliferativa, se caracteriza por angiogénesis, deposición de colágenos, formación de tejido granuloso, re-epitelización y contracción de la herida (Midwood et al., 2004). En la angiogénesis, como ya habíamos visto, las células endoteliales forman los nuevos vasos. En la fibroplasia y formación del tejido granuloso, los fibroblastos crecen y forman una nueva y provisional MEC al secretar colágeno y fibronectina. Durante la contracción de la herida, ésta se hace más pequeña, los miofibroblastos, que actúan como agarre en los bordes de la herida, se contraen usando un mecanismo similar al de las células musculares lisas. Cuando terminan su función, las células no necesarias entran en apoptosis. Por último, en la fase de

maduración y remodelado, el colágeno es reposicionado a lo largo de las líneas de tensión y las células que no se necesitan más, entran en apoptosis (Midwood et al., 2004).

Aunque este proceso no sea muy complicado, es frágil y susceptible de ser interrumpido. El fallo en el cierre de la herida es un importante problema clínico, no sólo en pacientes tras una cirugía, sino también en pacientes con condiciones crónicas como la diabetes. La incapacidad para el cierre de la herida en estos individuos puede resultar en una incapacidad mayor o incluso en la muerte (Reynolds et al., 2008). Durante los últimos años, han sido identificados importantes reguladores de la cicatrización. En particular, factores de crecimiento y citoquinas, como el TGF $\beta$  (Meng et al., 2008; Grose and Werner, 2004; Singer and Clark, 1999; Werner and Grose, 2003), el factor de crecimiento epitelial (EGF, *Epithelial Growth Factor*) y el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF, *Hepatocyte Growth Factor*) (Choi et al., 2004; Uruno et al., 2004; Ma et al., 2003).

El EGF juega un importante papel en la reepitelización al incrementar la proliferación de queratinocitos y la migración celular durante la herida



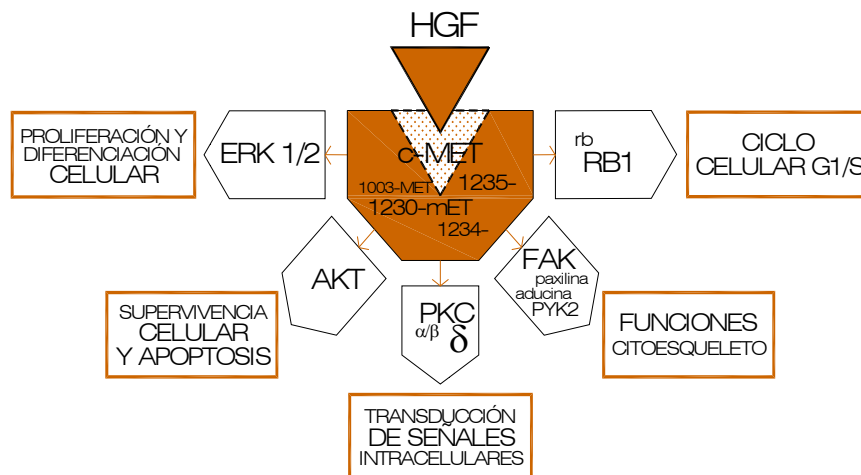


(Barrientos et al., 2008) tras unirse a su receptor (EGFR), una proteína tirosina quinasa transmembrana.

El TGF $\beta$  tiene un papel regulatorio en la cicatrización de la herida, ya que se encuentra incrementado en las plaquetas en respuesta a este proceso (Amendt et al., 2002; Schäfer and Werner, 2000), pero su papel exacto está todavía por determinar. Su delección o la de sus receptores ha resultado tanto en el incremento como en la disminución de la velocidad de cierre de la herida (Meng et al., 2008). Algunos investigadores han mostrado cómo el TGF $\beta$  exógeno inhibe la proliferación de queratinocitos *in vitro* e *in vivo* (Amendt et al., 2002). Sin embargo, dependiendo del tipo de modelo de reparación y la intensidad de la señalización de TGF $\beta$ , éste puede inhibir (Amendt et al., 2002; Hosokawa et al., 2005) o promover la reepitelización (Gailit et al., 1994; Reynolds et al., 2008; Meng et al., 2008). Por todo esto, su papel exacto y su regulación en este proceso continúan sin ser claros.

El HGF es una glicoproteína de unión a heparina derivada del mesénquima, involucrada en desarrollo, homeostasis y regeneración de diferentes tejidos. Está también relacionada con numerosos tipos de cáncer. HGF se sintetiza en fibroblastos,

células musculares lisas, macrófagos, células endoteliales, leucocitos y megacariocitos. Se secreta como precursor biológico inactivo (pro-HGF) y es activado por la unión proteolítica de sus subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  mediante puente disulfuro (Cruzado et al., 2004). HGF actúa como factor mitógeno, motógeno, morfogénico, antiapoptótico y angiogénico en varios tipos celulares (Zarnegar et al., 1995; Matsumoto et al., 1997) (Figura 11). Se ha visto que el HGF juega un papel crítico como mediador de las interacciones mesénquima-epitelio dando lugar a la proliferación y morfogénesis de las células epiteliales responsables de la organización parenquimal del hígado, pulmón, intestinos, riñón y otros órganos (Ono et al., 2009). El único receptor conocido para HGF es el receptor tirosina quinasa c-Met, que es producto del proto-oncogen c-met y está compuesto de una subunidad  $\alpha$  extracelular de 50kD y una subunidad  $\beta$  transmembrana de 145kD (Bottaro et al., 1991). La deficiencia de HGF o su receptor, causa letalidad en el embrión, motivado por un fallo en el desarrollo normal del hígado, músculo y placenta (Schmidt et al., 1995; Uehara et al., 1995).



**Figura 11.** Vía señalización de C-Met/HGF. HGF regula varias funciones biológicas de las células, incluyendo funciones del citoesqueleto, proliferación y diferenciación celular, supervivencia y apoptosis.

HGF y su receptor tienen gran importancia en la morfogénesis y organización de tejidos, durante el desarrollo embrionario y en la regeneración del tejido tras una herida. En modelos experimentales se ha observado, al realizarse una herida, un incremento en los niveles de HGF en sangre y de su ARN en tejidos como hígado, riñón y pulmón. Al neutralizar HGF después de la realización de una herida, se aumenta el daño tisular y se suprime la regeneración en casos de heridas hepáticas, renales, gástricas, cardíacas y pulmonares (Matsumoto and Nakamura, 2001).

Por otro lado se ha descrito que HGF estimula la migración y proliferación de queratinocitos *in vitro* (Matsumoto et al, 1991; Sato et al, 1995).

Existen estudios que indican que la expresión de HGF y su receptor están incrementados durante la respuesta a la herida cutánea (Cowin et al., 2001) y que su sobreexpresión resulta en un incremento de la vascularización y una expansión del tejido granuloso (Toyoda et al., 2001). No fue hasta 2003 que Yoshida et al. demostraron el papel de HGF en la herida cutánea al utilizar un modelo animal en el que suprimieron su expresión y comprobaron su participación en la re-epitelización, neovascularización y formación del tejido granuloso (Yoshida et



al., 2003). En células endoteliales y epiteliales, HGF induce migración, proliferación y angiogénesis (Rosen et al., 1993; Morimoto et al., 1991). También se han descrito los mecanismos por los que HGF media la migración de las células musculares lisas (Ma et al., 2003). Recientemente se ha descrito que las propiedades cicatrizantes del melón amargo son debidas a que incrementa el HGF, estimulando la proliferación de fibroblastos (Ono et al., 2009).

El papel de ILK en la reparación de las heridas no ha sido ampliamente estudiado. En órganos como el hígado, la expresión y actividad de ILK aumentan en respuesta a la herida. ILK es importante en la transducción de las señales extracelulares en las células estelares y, de esta manera, puede mediar fenotipos funcionales específicos en estas células hepáticas, claves en la respuesta a la herida en hígado (Shafiei and Rockey, 2006).

ILK también participa en la respuesta al daño en la célula muscular lisa. En experimentos de herida en la arteria carótida se ha encontrado una disminución en la expresión de ILK que conduce a un aumento en la migración y proliferación de estas células dando lugar al adelgazamiento de la neoíntima, lo que sugiere que ILK

ayuda a mantener el fenotipo quiescente en la pared normal del vaso (Ho et al., 2008). Por otro lado, GSK  $\beta$ , proteína fosforilada por ILK, como se ha descrito anteriormente, parece controlar la progresión del cierre de la herida y la fibrosis modulando los niveles de endotelina-1, al presentar los ratones deficientes en GSK  $\beta$  una velocidad de cierre incrementada con respecto a los controles (Kapoor et al., 2008).

## 8. ÓXIDO NÍTRICO COMO MODULADOR DE LA FUNCIÓN VASCULAR

Furchgott y Zawadzki, en 1980, describieron una sustancia producida por el endotelio vascular, al que denominaron factor relajante derivado del endotelio (EDRF, *Endothelium-derived relaxing factor*), que actuaba en el músculo liso de los vasos, produciendo relajación del mismo. En 1987 el EDRF fue identificado como NO, tras comprobar que presentaban la misma actividad biológica, la misma estabilidad y la misma susceptibilidad a inhibidores y potenciadores (Palmer et al., 1987; Ignarro et al., 1987).

El NO es un gas soluble altamente reactivo y tiene una vida media de diez segundos. Es una molécula lipofílica por lo que difunde desde la célula donde se sintetiza hasta las células próximas, sin necesidad de ningún transportador de membrana (Tsutsui et al., 2006). El NO está implicado en numerosos procesos fisiológicos como la relajación del músculo liso, neurotransmisión, agregación plaquetaria así como en el sistema inmune. Además, juega un papel muy importante en enfermedades inflamatorias como la artritis, miocarditis y nefritis e incluso en condiciones patológicas como cáncer, diabetes y enfermedades

neurodegenerativas (Davis et al., 2001; Hanafy et al., 2001).

Una disminución en la síntesis o incremento en la degradación del óxido nítrico ha sido postulado como el mecanismo responsable de la disfunción endotelial, considerada como una dilatación vascular defectuosa tras un determinado estímulo (González-Santiago et al., 2002).

### 8.1. Óxido nítrico sintasas

El NO es producido por las óxido nítrico sintasas (NOSs, *Nitric Oxide Synthases*) en respuesta a diferentes estímulos químicos o fisiológicos. Las NOS son homodímeros compuestos por tres dominios funcionales: el dominio oxigenasa amino terminal que contiene los sitios de unión a L-arginina, el grupo hemo y tetrahidrobiopterina (TH<sub>4</sub>, *Tetrahydrobiopterin*), un sitio de reconocimiento a calmodulina y el dominio reductasa carboxiterminal, que contiene los sitios de unión a flavín adenín dinucleótido (FAD, *Flavin Adenine Dinucleotide*), flavín mononucleótido (FMN, *Flavin Mononucleotide*) y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH, *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*) (Alderton et al., 2001).



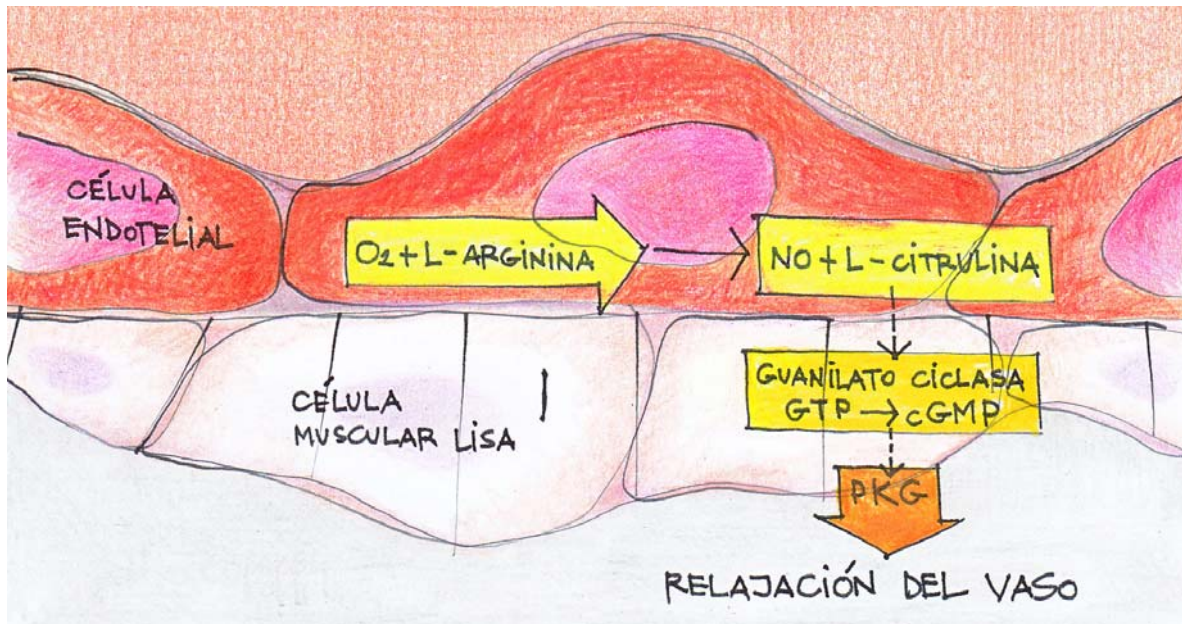
Se han identificado tres genes distintos localizados en diferentes cromosomas que codifican las tres isoformas conocidas de la NOS, la neuronal, la endotelial y la inducible. Las dos primeras se expresan constitutivamente en el sistema nervioso y el endotelio vascular respectivamente y la inducible es un enzima que se expresa en macrófagos y hepatocitos en respuesta a endotoxinas y citoquinas proinflamatorias. Existen evidencias que demuestran la regulación de la NOS inducible en macrófagos por ILK a través de un mecanismo que implica a PKB/Akt y NF- $\kappa$ B además de la regulación de la ciclooxigenasa 2, lo que implica a ILK como una potencial diana en tratamientos antiinflamatorios (Tan et al., 2002).

Las NOS catalizan la conversión del aminoácido L-arginina en L-citrulina y NO. Esta reacción requiere  $O_2$  y poder reductor en forma de NADPH e implica la transferencia de electrones desde el NADPH pasando por FAD, FMN, TH4 hasta el grupo hemo. Actúan como cofactores el  $Ca^{2+}$  y la calmodulina.

## 8.2. Vías de señalización del NO. La guanilato ciclasa soluble (sGC) como receptor intracelular del NO

El NO sintetizado en las células endoteliales difunde a las células musculares lisas donde se une al grupo hemo de su receptor natural, la guanilato ciclasa soluble (sGC, *Soluble Guanylyl Cyclase*), dando lugar a la formación de guanosina monofosfato cíclico (cGMP, *Cyclic Guanosine Monophosphate*) (Murad et al., 1990). El cGMP va a ser necesario para la activación de la quinasa dependiente de cGMP (PKG, *Protein Kinase G*), que fosforila distintos sustratos produciendo relajación de las células musculares lisas (Fukao et al., 1999) (Figura 12).

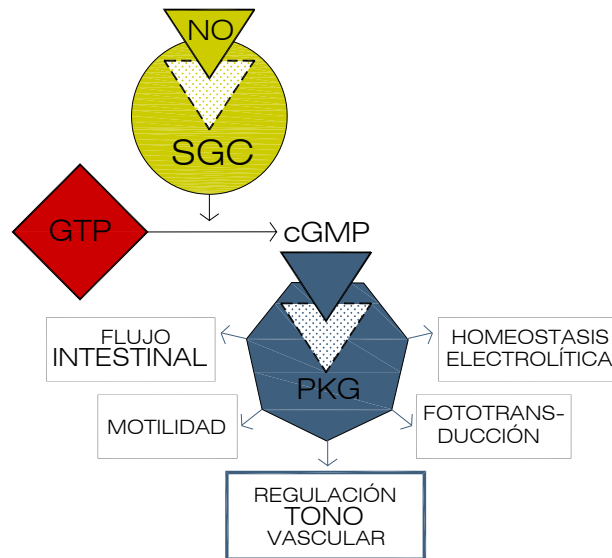
A través de la vía del cGMP/PKG el NO ejerce su actividad vasodilatadora manteniendo el tono vascular (Moncada et al., 1989; Furchgott, 1990; Ignarro, 1990; Vane et al., 1990). Inhibe, además, la agregación y adhesión plaquetaria, la adhesión leucocitaria y regula la proliferación y migración de células musculares lisas (SMC, *Smooth Muscle Cells*) (Sarkar et al., 1996; Brown et al., 1999).



**Figura 12. Vía de señalización del óxido nítrico.** El óxido nítrico es sintetizado por las óxido nítrico sintetasas en una reacción en la que el sustrato L-arginina se convierte en L-citrulina con el oxígeno y el NADPH como cofactores. Difundirá, además de hacia el lumen, hacia la célula muscular lisa donde a través de la GC y de la PKG provocará la relajación del vaso.

La sGC es un heterodímero formado por dos subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de 82 y 70 kDa respectivamente. Existen dos isoformas de cada subunidad denominadas  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$  y  $\beta_2$ . El heterodímero más abundante es el  $\alpha_1\beta_1$  y se ha clonado en oveja, ratón, rata y humano (Koesling et al., 1990; Zabel et al., 1998). Las subunidades de los heterodímeros están compuestas por tres dominios funcionales: el dominio amino terminal, también denominado dominio regulador, donde se localiza el grupo hemo, que es el centro de unión al ligando, el dominio central que media la dimerización y el dominio carboxilo terminal que contiene la región catalítica y es responsable del reconocimiento del sustrato.

La sGC, a través de la producción de cGMP, es capaz de realizar una gran variedad de efectos biológicos como son la regulación del tono vascular, motilidad, fototransducción, flujo intestinal y la homeostasis electrolítica. Para llevar a cabo estos procesos el cGMP actúa directamente sobre la PKG, los canales iónicos dependientes de nucleótidos monofosfato cíclicos (CNG, Cyclic Nucleotide-Gated channel) y las fosfodiesterasas (PDE, PhosphoDiEsterase), transmitiendo la señal que se traducirá en el efecto biológico específico (Krumenacker et al., 2004) (Figura 13).



**Figura 13. Vía señalización NO-sGC-PKG.** La sGC actúa como receptor del óxido nítrico (NO) y convierte el GTP en cGMP que se une al dominio regulador y activa a la proteína quinasa G (PKG), dando lugar a los distintos procesos celulares.

Está ampliamente descrito que en algunas enfermedades cardiovasculares como la hipertensión, aterosclerosis y diabetes se producen cambios en los niveles de la sGC (Kloss et al., 2000; Ruetten et al., 1999; Melichar et al., 2004). Recientemente se ha descrito cómo BAY 41-2272, un estimulador de la sGC, conduce a un aumento de los niveles de cGMP y puede ser efectivo en reducir la fibrosis durante la hipertensión al disminuir la generación de angiotensina II (AII, *Angiotensine II*) (Masuyama et al., 2009). La AII es una proteína que causa la constricción de los vasos sanguíneos y hace aumentar la presión arterial, además de jugar un significativo papel en la progresión del daño tisular que acompaña a las enfermedades cardiovasculares (García et al., 2009).

ILK juega un papel en la regulación de la expresión de la sGC. La activación de ILK por COL I en células mesangiales da lugar a una disminución de sGC, disminuyendo la respuesta al NO y contribuyendo al daño glomerular (De Frutos et al., 2005). Por otro lado, se ha observado que el tratamiento crónico con donadores de NO, produce la inactivación de la sGC. En este proceso conocido como taquifilaxia se consigue una pérdida de respuesta, tras la administración crónica de donadores como la nitroglicerina, el nitroprusiato (SNP, *Sodium Nitroprusside*) o el dinitrato de isosorbide (IDN, *Isosorbide Dinitrate*).

### 8.3. Vías de señalización del NO. La proteína quinasa G (PKG) como efector celular del cGMP.

La PKG pertenece a la familia de las serina/treonina quinasas y está presente en diversidad de células eucariotas (Lohmann et al., 1997). Existen dos isoformas PKG I y II. Ambas son homodímeros formados por dos subunidades de 75 y 85 kDa respectivamente y comparten características estructurales. Cada subunidad está compuesta por tres dominios funcionales: el dominio amino terminal responsable de la dimerización de las subunidades mediante una región de cremallera de leucina. Además contiene sitios de autofosforilación lo cual le confiere la capacidad de autorregular la actividad enzimática y también posee secuencias para modificaciones postranscripcionales que determinan las diferentes localizaciones subcelulares. Un dominio regulador que contiene dos sitios de unión al cGMP y un dominio quinasa que cataliza la transferencia del fosfato del ATP al grupo hidroxilo del residuo serina o treonina de la proteína diana (Feil et al., 2003).

El agonista principal de PKG es el cGMP. La unión de cGMP al dominio regulador produce un cambio conformacional que libera al dominio

catalítico de la inhibición del extremo N-terminal, permitiendo así la fosforilación de las proteínas sustrato (Wall et al., 2003) (Figura 13). Se han identificado más de diez sustratos que son fosforilados por PKG I, destaca por su función en la regulación del citoesqueleto de actina fosforilando VASP, que se encuentra en músculo liso, plaquetas e hipocampo (Hofmann et al., 2006). Se ha descrito una disminución en el contenido proteico o en la actividad de la PKG en determinadas enfermedades como hipertensión, diabetes o envejecimiento (Russo et al., 2008).





## 9. METODOLOGÍA DEL KNOCK-OUT CONDICIONAL PARA ILK

El desarrollo de tecnologías, como la recombinación mediada por Cre-loxP o por los ARN de interferencia, han sido estrategias fundamentales en el estudio de la delección de ILK, dada su naturaleza letal.

En este apartado de la Introducción se resumen los avances de la biología molecular y las posibilidades que han generado el conocimiento detallado de un gen y el desarrollo de metodologías celulares y moleculares que permiten la modificación *in vivo* de la expresión o función de un fragmento de ADN en particular. Cabe destacar a este respecto la diferencia entre los términos transgénico y *knock-out*.

Los animales transgénicos portan un fragmento de ADN exógeno en su genoma. Estos animales se fabrican usando una construcción transgénica (plásmido de ADN con la secuencia del gen que se piensa introducir). Con técnicas de ADN recombinante y de micromanipulación o transfección, se introducen en la célula blanco para que se inserte este nuevo gen al azar en el genoma celular. Todos los organismos cuyo genoma tiene un gen añadido o alterado en sus células

(incluyendo las células germinales), y portan el gen nuevo o alterado son, en el sentido estricto de la palabra, organismos transgénicos. Es decir, todo gen añadido al repertorio genético de un organismo, con la consecuente ganancia de función otorgada por el transgen, recibe el término de animal transgénico.

Un animal *Knock-out* o *Knock-in*, es aquel con una mutación dirigida (mutación en un sitio predeterminado) que con frecuencia producirá una delección funcional del gen. A esta eliminación específica se le ha denominado gen diana y el producto es un animal mutante que carece de la expresión específica de ese gen y recibe el nombre de animal *knock-out*. Por otro lado, un organismo al que se le ha sustituido un gen normal por otro alterado, con mutaciones específicas, recibe el nombre de *knock-in*.

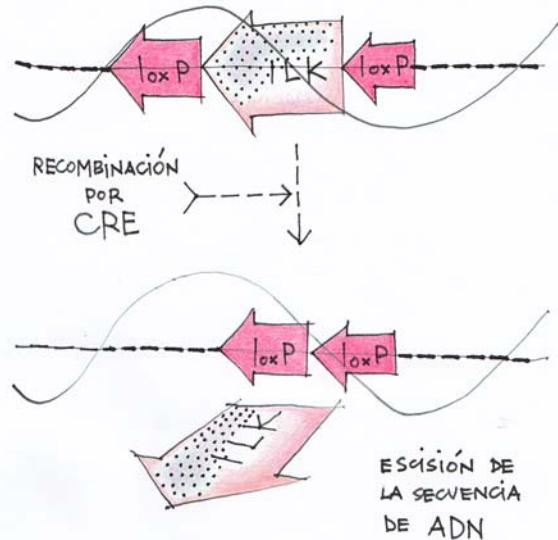
### 9.1. El sistema Cre-loxP

La tecnología Cre-loxP fue introducida en la década de los 80 (Sauer et al. 1988, Sternberg et al. 1981) y ha sido aplicada en levaduras, plantas, cultivos de células mamíferas y en ratones (Araki et al., 1997). El sistema de recombinación específica Cre-loxP emergió como una importante herramienta para la generación

de ratones con mutaciones específicas en el ADN. De esta manera constituye un método de ingeniería genética para crear el modelo knock-out condicional, ya que se conseguirá la deleción específica del gen en aquella célula donde Cre se exprese y se active. Este método otorga la capacidad de controlar la actividad de un gen en casi todos los tejidos del ratón, abriendo así nuevos caminos para estudiar la función del gen y establecer sofisticados modelos animales de enfermedades humanas (Feil et al., 2009).

El gen cre, término que hace referencia a recombinación en círculo o *Cyclization Recombination*, codifica una recombinasa denominada Cre, que pertenece a la familia de recombinasas sitio-específicas. Esto significa que puede recombinar ADN cuando se localiza entre secuencias específicas, llamadas loxP (Hamilton and Abremski, 1984). Estas secuencias, de 34 pares de bases (pb) tienen un centro espaciador de 8 pb y dos secuencias palindrómicas a ambos lados de 13 pb. Ese centro asimétrico define la orientación del sitio loxP. El mecanismo molecular de este sistema se denomina recombinación recíproca y consiste en que la doble hebra de ADN es primero cortada en ambos sitios loxP por la proteína Cre y luego re-unida (pegada) otra vez

(Voziyanov et al., 1999). Como resultado, el ADN entre los sitios loxP es escindido y subsecuentemente degradado, en un proceso rápido y sencillo (Figura 14).



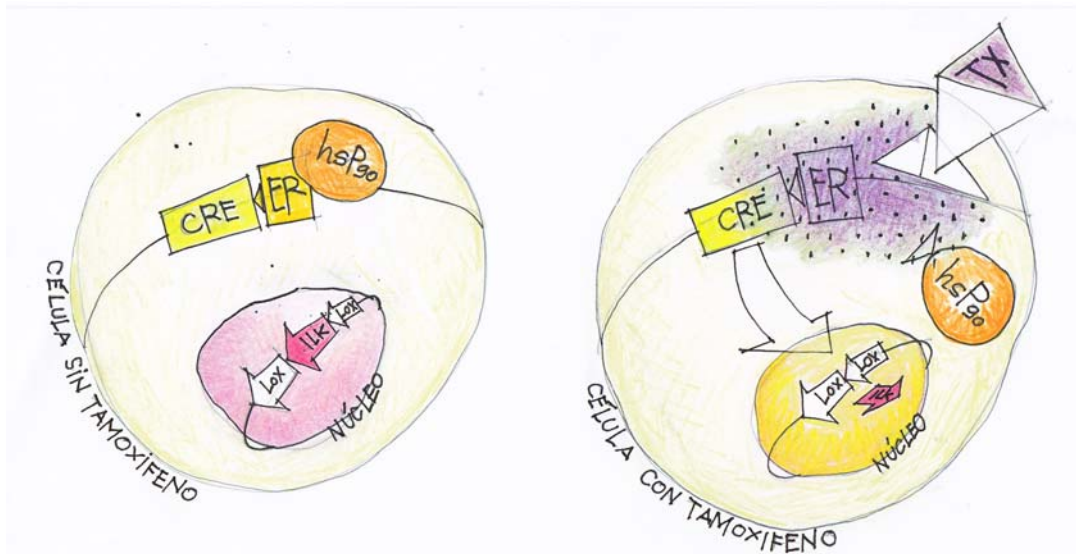
**Figura 14. Función de Cre.** Las secuencias loxP son reconocidas por Cre, que inicia la recombinación y escinde la secuencia de ADN flanqueada por loxP.

Para que la proteína Cre se sintetice es necesario que el gen Cre esté bajo la dirección de un promotor. Esto es una secuencia de ADN que va a reclutar la maquinaria celular necesaria para iniciar el proceso conocido como expresión génica. La función del promotor puede ser regulada de manera tejido específica, siendo activada en determinados tipos celulares, o puede ser inducida por la presencia de un factor o condición específica acuñando el término condicional (Kuhn et al., 2002).

## 9.2. Combinación con un sistema inducible: Tamoxifeno

Se han descrito varios modos de controlar espacial o temporalmente la expresión de la recombinasa (Gorman and

lugar a que quede secuestrado en el citoplasma por Hsp90 (Mattioni et al., 1994; Picard 1994) impidiendo que suceda la recombinación mediada por Cre en el núcleo; sin embargo, la unión del 4-OHT rompe la interacción con Hsp90,



**Figura 15. Inducción por Tamoxifeno del sistema Cre-loxP.** En la célula sin tamoxifeno Cre se encuentra unida al receptor de estrógeno mutado y a Hsp90, que los recluta en el citoplasma. Al difundir el tamoxifeno al interior celular se rompe la unión entre Hsp90 y el receptor y el complejo se transloca al núcleo iniciándose la recombinación.

Bullock, 2000; Nagy, 2000; Rossant and McMahon, 1999). En uno de ellos, un gen de fusión es creado entre Cre y una forma mutada del dominio de unión del receptor de estrógenos (RE). Esta mutación evita la unión de su ligando natural (17 $\beta$ -estradiol) a concentraciones fisiológicas, y le confiere capacidad de respuesta al unirse el 4-hidroxi(OH)-tamoxifeno (4-OHT) (Danielian et al., 1993; Fawell et al., 1990; Littlewood et al., 1995). La fusión de Cre con el RE da

permitiendo el acceso de Cre-RE al núcleo e iniciándose así la recombinación (Figura 15). El tamoxifeno funciona de este modo como el inductor del sistema en el que el RE mutado actúa como regulador.

---

**Hipótesis**



En el normal funcionamiento de un tejido es fundamental la comunicación entre las células que lo forman y su entorno. Los cambios que afecten a esta comunicación pueden, por tanto, tener consecuencias importantes. La quinasa ligada a integrinas (ILK) es un mediador clave en la comunicación entre las células y el medio extracelular regulando procesos como crecimiento, proliferación, supervivencia, diferenciación, migración, invasión y angiogénesis. Las consecuencias de su déficit han sido estudiadas *in vitro* en diversos tipos celulares y en situaciones patológicas, sobre todo en el contexto de la organogénesis. Sin embargo, las alteraciones estructurales y funcionales inducidas por su delección en el animal adulto no han sido estudiadas hasta el momento.

La presente Tesis Doctoral propone que ILK tiene un papel clave en la regulación de la estructura y función tisular en animales adultos, actuando a través de diferentes vías intracelulares que son fundamentales para el correcto funcionamiento de los tejidos y su capacidad de respuesta ante un daño. La delección condicional de ILK en un modelo murino producirá cambios estructurales y fisiológicos importantes en diversos tejidos, que repercutirán en cambios en su funcionalidad y en su capacidad de respuesta ante un daño.

A horizontal orange line extends from the left edge of the page towards the word 'Objetivos'. To the right of the word, there are two overlapping orange rectangular shapes: a smaller, lighter-colored one in front of a larger, darker-colored one.

## Objetivos

1.- Generar un modelo experimental de *knock-out* condicional para ILK en ratón,

- Estableciendo las pautas de administración del tamoxifeno para conseguir la delección del gen de ILK y la reducción significativa de sus niveles proteicos en los tejidos de interés.
- Analizando el comportamiento de los animales controles en las mismas condiciones de tratamiento.

2.- Estudiar la implicación de la delección de ILK en la función vascular,

- Evaluando las consecuencias del déficit de ILK en el contenido arterial de proteínas relacionadas con la respuesta al óxido nítrico.
- Estudiando el efecto biológico de estos cambios.
- Analizando su importancia en situaciones fisiopatológicas.

3.- Estudiar las consecuencias de la delección de ILK en los procesos de reparación de tejidos, utilizando el modelo de herida cutánea,

- Estableciendo las consecuencias del déficit de ILK en la reparación del tejido de la piel.
- Analizando los mecanismos celulares implicados.

---

## **Materiales y Métodos**



### 1. ESTUDIOS IN VIVO

#### 1.1. Animales de experimentación

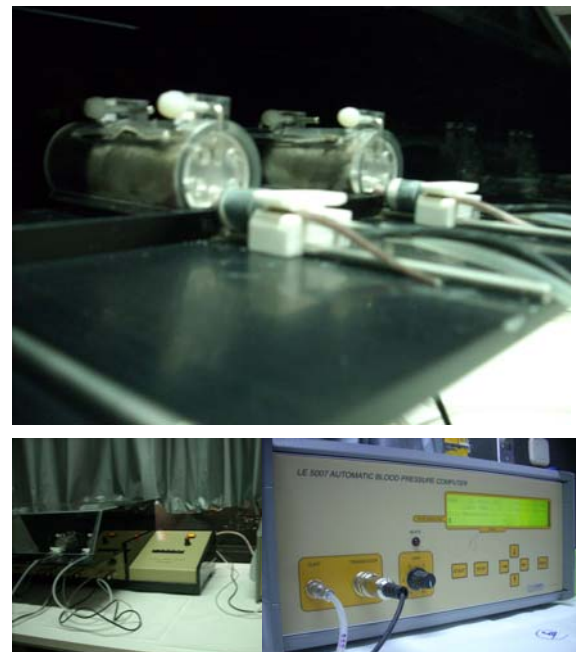
Todos los experimentos in vivo se realizaron en un mutante condicional para ILK obtenido mediante el sistema Cre-lox. La generación de este modelo experimental constituye el primer bloque de resultados de la presente tesis y se ha incluido, por tanto, en la sección de resultados. Todos los animales utilizados fueron machos de unos tres meses de edad que fueron tratados con 300µL de aceite de maíz (vehículo, Sigma-Aldrich C8267) o 1,5 mg/día/ratón de 4-OH-tamoxifeno (tamoxifeno, Sigma-Aldrich H6278) para producir la delección de ILK. Los animales se trataron durante cinco días consecutivos y, tras comprobar su delección, se utilizaron tres semanas después de la última inyección para los distintos modelos experimentales.

Para los experimentos controles se utilizaron ratones con genotipo Cre (ILK, Cre) y Lox (ILK<sup>+/+</sup>) para estudiar el efecto del tamoxifeno, siguiendo las mismas pautas de administración.

#### 1.2. Diseño experimental

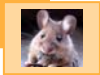
##### 1.2.1. Medida de presión arterial y respuesta a la estimulación de la sGC y la PKG

La presión arterial sistólica fue medida en ratones conscientes con un esfigmomanómetro de cola (LE 5007 automatic blood pressure computer; Leica) (Figura 16).



**Figura 16. Equipo medida presión arterial.** Imagen superior ratones en cepo con el esfigmomanómetro en la cola. Abajo aparato de registro de medidas.

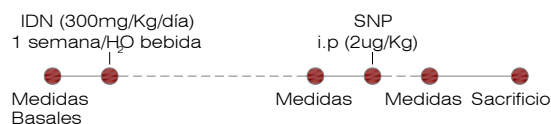
Se tomaron medidas basales durante 15 minutos y se calculó el valor de la presión sistólica media de cada ratón, a continuación se procedió a la inyección de los distintos hipotensores, el nitroprusiato sódico (SNP, Sodium Nitroprusside; Sigma



Aldrich S0501, 0.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), agonista de la sGC, y de 8-Bromo-GMP cíclico (8-Br, 8-Bromoguanosine salt 3'5'-sodium monophosphate; Fluka 17110, 1  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ), análogo del cGMP y como tal, estimulador de la PKG. Una vez inyectados los compuestos se registraron, durante los 15 minutos siguientes, las medidas de presión arterial sistólica. Se calculó el promedio de las medidas registradas cada cinco minutos desde la administración intraperitoneal de los compuestos.

#### 1.2.1.1. Inducción de taquifilaxia.

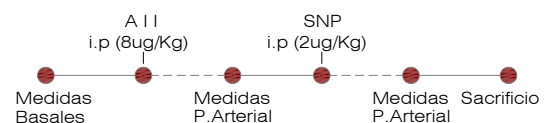
La taquifilaxia se indujo por administración de dinitrato de isosorbide (IDN, *Isosorbide Dinitrate*; Sigma-Aldrich I1759, 300 mg/kg/día) en el agua de bebida durante una semana (Ruiz-Torres et al., 2008). Tras este periodo, se registró la presión arterial basal y los cambios en la presión arterial en respuesta a la inyección de SNP (2  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) en los 15 minutos siguientes a la administración intraperitoneal del compuesto (Figura 17).



**Figura 17. Diseño experimental respuesta durante la taquifilaxia.** El gráfico muestra los diferentes momentos de tratamientos y registro de medidas de presión arterial.

#### 1.2.1.2. Modelo experimental de hipertensión aguda con Angiotensina II

Tras registrar la presión arterial basal, los animales fueron tratados con angiotensina II (All; Fluka 10383, 0.8  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) intraperitoneal. El tiempo máximo de respuesta se encontró entre los cinco primeros minutos y tuvo una duración de 17 minutos. Se evaluó, por tanto, la respuesta a SNP dentro de este periodo. La inyección de SNP (2  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) se realizó cinco minutos después de la administración de All y se estudiaron los cambios producidos en los cinco minutos siguientes, que es también su tiempo de respuesta máxima. Se calculó el promedio de las medidas registradas los cinco minutos siguientes a la administración intraperitoneal de los compuestos y se representó como el incremento de la presión sistólica con respecto a la basal (Figura 18).



**Figura 18. Diseño experimental respuesta durante la hipertensión.** El gráfico muestra los diferentes momentos de tratamientos y registro de medidas de presión arterial.

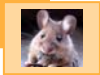
### 1.2.2. Modelo experimental de herida

Los animales fueron anestesiados por inhalación de isoflurano (Esteve Veterinaria) y la piel dorsal fue afeitada con máquina eléctrica en primer lugar y después con ayuda de crema depilatoria (Veet). Después de desinfectar con etanol al 70%, se realizaron cuatro heridas bilaterales con un punch para biopsias de 4 mm de diámetro (Miltex Inc.) (Figura 19) (Kapoor et al., 2008).

Las heridas fueron fotografiadas (PowerShot Pro1, Canon) y dibujados sus contornos para posterior escaneado y medida del área con Motic Images Plus 2.0 Software (Motic China Group Co., Ltd). Este proceso se repitió cada día desde el día 0 (día de la herida) hasta los 10 días posteriores y el porcentaje de cierre para cada día se estableció con la siguiente fórmula  $(1 - [\text{área actual herida} / \text{área inicial herida}]) \times 100$ . Los animales fueron sacrificados en distintos días para la obtención de las biopsias de piel y someterlas a los distintos estudios, PCR, inmunohistoquímica y western blot.



**Figura 19. Realización de heridas en ratones.** Cada imagen va describiendo el proceso de realización de la herida, desde la anestesia, el depilado, la realización de la herida y el dibujo del área.



### 1.2.3. Modelo experimental de electroporación de HGF

Se utilizó el plásmido pCMV/hHGF (Riera et al., 2004), que fue amplificado (*Escherichia coli* JM-109) y purificado (kit *Endofree plasmid Giga*; Quiagen). El ADN fue disuelto en agua libre de endotoxinas a una concentración de 4 µg/µL. En algunos animales de experimentación se procedió, dos días antes de la realización de la herida, a la transfección intramuscular del gen de HGF mediante electroporación. Para ello, 1 hora antes, 15 µL de hialuronidasa fueron inyectados a cada ratón para optimizar la electroporación. Se inyectaron 50 µL de igual volumen del portador no iónico SP1017 (0.02 %) y hHGF (4 mg/mL) en el músculo tibial anterior seguido de electroporación (6 pulsos de 100 ms cada uno a una potencia de 50 V y frecuencia de 1 Hz). La técnica fue llevada a cabo por el grupo del Dr. Joseph M. Grinyó (Laboratorio de Nefrología del Hospital Universitario Bellvitge, Universidad de Barcelona).

### 1.2.4. Organización de recogida de muestras

En todos los diseños experimentales expuestos, tras el sacrificio del animal por anestesia (isoflurano) y posterior dislocación cervical, o en otros casos, sangrado del corazón si se precisaba la

sangre para estudio, se extrajeron muestras de pulmón, hígado, corazón, aorta, riñón y herida (en su caso), para posteriores estudios. Las muestras se recogieron en nitrógeno líquido y fueron almacenadas a -80 °C hasta su uso.

## 1.3. Técnicas empleadas

### 1.3.1. Histología

Los tejidos, aortas o heridas cutáneas fueron incluidos en parafina, cortados en láminas de 3 µm y montados en cristales de poly-L-lisina (Polysine®; Fisher Scientific). Después se desparafinaron con xileno (Panreac 211769.2711) y se hidrataron mediante un gradiente decreciente de etanol. En el caso de las heridas, la morfología se evaluó por tinción con hematoxilina / eosina (Sigma-Aldrich GHS1128/HT110280), llevada a cabo en colaboración con el grupo del Dr. Raimundo García del Moral (Departamento de Anatomía Patológica, Universidad de Granada). Se realizó una valoración cuantitativa de acuerdo a la puntuación propuesta por Greenhalgh et al., 1990 (Tabla 2).

Tabla 2. Valoración histológica

Puntuación	Criterios
1-3	Ninguna o mínima acumulación celular. Ausencia de tejido de granulación o de desplazamiento epitelial.
4-6	Tejido de granulación fino, inmaduro, dominado por las células inflamatorias, con pocos fibroblastos, capilares o depósito de colágeno. Mínima migración epitelial.
7-9	Tejido de granulación moderadamente grueso, oscilando entre el predominio de células inflamatorias hasta el de fibroblastos con depósito de colágeno. Extensa neovascularización. Migración epitelial que oscila desde mínima a moderada.
10-12	Tejido de granulación grueso, vascularizado, dominado por la presencia de fibroblastos y extenso depósito de colágeno. Epitelio de parcial a completamente presente recubriendo la gran mayoría o la totalidad de la superficie de la herida.

### 1.3.2. Extracción y medida de ADN

Porciones de piel, cola o aorta fueron procesadas para la extracción de ADN con la intención de genotipar (cola de ratón), o de comprobar la delección de ILK (corazón, hígado, riñón, piel, aorta).

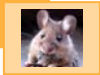
Una pequeña cantidad de tejido (0,5 g aproximadamente) se homogeneizó en 0,5 mL de tampón de lisis (Tris 100 mM, EDTA 5 mM, NaCl 200 mM, SDS 2 %) con proteinasa K (0,5 mg/mL; Sigma-Aldrich P6556). Se incubó toda la noche (o/n, *over night*) a 55 °C en un baño con agitación. Al día siguiente se añadió una mezcla de fenol:cloroformo 5:1 (Sigma-Aldrich P1944) y tras 1 hora de agitación en orbital se centrifugaron las muestras. Tras la separación de fases, se pipeteó la superior a un tubo nuevo y se precipitó el ADN con etanol 100 % (por inversión a los pocos

segundos). Se centrifugó, el pellet, se lavó con etanol al 70 % frío y tras secado del pellet se resuspendió en agua estéril. La cuantificación y pureza del ADN se determinó por la medida en Nanodrop®.

#### 1.3.2.1 Análisis por PCR

Un µg de ADN fue sometido a una amplificación por PCR (Promega A1250) usando para el transgen Cre una *multiplex*, RNA3: 5'GTCAGTACACATACAGACTT3', ERT2: 5'TCCATGGAGCACCCAGTGAA y Pol3: 5'TGAGCGAACAGGGCGAA3', obteniendo un fragmento de 780 pb para el alelo transgénico y 450 pb para el salvaje (WT, *wild type*).

Para monitorizar la delección de ILK, los cebadores usados fueron 5'CCAGGTGGCAGAGGTAAGTA3' y 5'CAAGGAATAAGGTGAGCTTCAGAA3', los



cuales amplifican tres fragmentos, uno de 2.1kb para ILK +/+, otro de 1.9kb para ILK +/- ó -/- y de 230 pb para el fragmento escindido por Cre. La PCR se llevó a cabo en un termociclador (PTC-100<sup>TM</sup> Programmable Thermal Controller; MJ Research Inc) con el programa mostrado en la **Tabla 3**. Los productos de la PCR se separaron en gel de agarosa al 1 % (Pronadisa 8034) con bromuro de etidio. El gel fue fotografiado en exposición a luz ultravioleta (Lumi-Imager F1; Roche).

lisis (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, deoxicolato sódico 0.1 %, tritón x-100 1 % y pH=7.6) al que se añade un cóctel de inhibidores de proteasas (Roche 11836153001). En el caso de las células, tras realizar los experimentos correspondientes, se lavaron con PBS y se recogieron en el tampón de lisis descrito anteriormente. Tejidos o células se incubaron con este tampón durante 30 minutos a 4 °C y se centrifugaron a 11000 rpm durante 30 minutos a 4 °C. Los precipitados se desecharon, conservándose únicamente los sobrenadantes de los

**Tabla 3. Programas para PCR**

Programa CRE	Programa LOX
94°C - 3 minutos 94°C - 30 segundos 55°C - 30 segundos 68°C - 1 minutos 68°C - 5 minutos	94°C - 3 minutos 94°C - 45 segundos 58°C - 45 segundos 68°C - 2 minutos 68°C - 7 minutos
29 ciclos	35 ciclos

### 1.3.3. Determinación de niveles proteicos

#### 1.3.3.1. Análisis por Western Blot

Los tejidos, piel y aorta, se congelaron rápidamente tras el sacrificio del animal en nitrógeno líquido, posteriormente se colocaron en un mortero sobre el nitrógeno para que se conservaran en este estado y conseguir su homogeneización por pulverización, recogiendo este polvo sobre tampón de

lisados celulares. Para la cuantificación de proteínas totales se utilizó el kit *Dc Protein Assay* (BIO-RAD 500-0113/4/5).

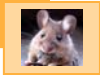
Las proteínas se separaron por electroforesis según la técnica de Western Blot (Towbin et al., 1992) para cuantificar la expresión de distintas proteínas, en geles de poliacrilamida al 7.5 % (BIO-RAD 161-0156). Después, las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (Perkin Elmer NEF1002001). Las membranas se

bloquearon para evitar uniones inespecíficas en tampón TBS con 0.1 % de Tween 20 (Sigma-Aldrich P1379) al 5 % de leche (leche en polvo desnatada; Central Lechera Asturiana) durante una hora a temperatura ambiente. A continuación se incubaron o/n con los correspondientes

anticuerpos primarios (Tabla 4) diluídos en TBS con 0.1 % de Tween 20 y al 3 % de BSA (Sigma-Aldrich A9647). Seguidamente se incubó con el correspondiente anticuerpo secundario y se reveló con ECL (Thermo Scientific 32106).

**Tabla 4. Relación de Anticuerpos utilizados para Western Blot**

ANTICUERPO PRIMARIO	CASA COMERCIAL REFERENCIA	ANTICUERPO SECUNDARIO
AT-ILK (1:1000)	R&D Systems (MAB4266)	AT-Mouse (1:3000; DAKO: P0260)
AT- sGC $\beta$ 1 (1:1000)	Sigma-Aldrich (G4405)	AT-Rabbit (1:5000; Chemicon: AP132P)
AT-PKG (1:1000)	Stressgen (KAP-PK002)	AT-Rabbit (1:5000; Chemicon: AP132P)
AT-PVASP (Ser 239) (1:1000)	Cell Signaling (3114)	AT-Rabbit (1:5000; Chemicon: AP132P)
AT-HGF $\alpha$ (1:1000)	Santa Cruz (sc-1357)	AT-Goat (1:3000; Santa Cruz: sc-2020)
AT-PAKT (Ser 473) (1:1000)	Cell Signaling (9271)	AT-Rabbit (1:5000; Chemicon: AP132P)
AT-PGSK (Ser 9) (1:1000)	Cell Signaling (9396)	AT-Rabbit (1:5000; Chemicon: AP132P)
AT-GAPDH (1:5000)	Sigma-Aldrich (G8795)	AT-Mouse (1:3000; DAKO: P0260)
AT- $\alpha$ -Actin (1:1000)	Sigma-Aldrich (A2066)	AT-Rabbit (1:5000; Chemicon: AP132P)
AT-AKT (1:1000)	Cell signaling (9272)	AT-Rabbit (1:5000; Chemicon: AP132P)
AT-GSK (1:1000)	Cell Signaling (9332)	AT-Rabbit (1:5000; Chemicon: AP132P)
AT-VASP (1:1000)	Cell Signaling (3112)	AT-Rabbit (1:5000; Chemicon: AP132P)



### 1.3.3.2. Ensayo de ELISA

La cantidad de HGF humano existente en la circulación del ratón tras la transfección del plásmido por el tratamiento de electroporación fue evaluada mediante ELISA (Quantikine® kit; R&D Systems DHG00) siguiendo las especificaciones del fabricante. Para ello las muestras de sangre se extrajeron del corazón y fueron recogidas en tubos con heparina, centrifugadas a 3000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, para la obtención de los plasmas, y congeladas hasta posterior uso.

### 1.3.3.3. Inmunohistoquímica

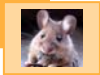
El tejido incluido en parafina (aorta, piel) se cortó en secciones de 3 µm usando un microtomo (Microm). Las secciones se recogieron sobre portaobjetos de Polysine® (Fisher Scientific). Las secciones se desparafinaron en xileno y se rehidrataron por inmersión en concentraciones decrecientes de alcohol.

El desenmascaramiento antigénico se realizó manteniendo las muestras durante 2 minutos en una olla a presión. A continuación se bloqueó la peroxidasa endógena incubando con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Panreac 141077.1211) al 3 % durante 5 minutos quedando cada muestra cubierta por la solución pintando un círculo a su alrededor con rotulador (DAKOpen S2002). Tras un lavado con PBS, se incubaron o/n las muestras con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla 5) diluido con PBS al 0.1 % de BSA. Como control negativo se utilizaron secciones a las que no se añadió el anticuerpo primario. Al día siguiente se incubó con el secundario durante 1 hora, tras un lavado con PBS, y después se reveló con el cromógeno diaminobencidina (DAB; DAKO K3466) hasta que el color fue suficiente (aproximadamente 5 minutos). Las secciones se contrastaron con hematoxilina de Mayer y se montaron con DPX (Panreac 255254).



Tabla 5. Relación de Anticuerpos utilizados para Inmunohistoquímica

ANTICUERPO PRIMARIO	CASA COMERCIAL REFERENCIA	ANTICUERPO SECUNDARIO
AT-ILK (1:100)	R&D Systems (MAB4266)	AT-Mouse (1:100; DAKO: P0260)
AT- sGC $\beta$ 1 (1:200)	Sigma-Aldrich (G4405)	AT-Rabbit (1:100; Chemicon: AP132P)
AT-PKG (1:500)	Stressgen (KAP-PK002)	AT-Rabbit (1:100; Chemicon: AP132P)
AT-HGF $\alpha$ (1:300)	Santa Cruz (sc-1357)	AT-Goat (1:200; Santa Cruz: sc-2020)
AT-Ki67 (1:100)	Thermo Scientific (RM9106-So)	AT-Rabbit (1:100; Chemicon: AP132P)



## 2. ESTUDIOS EX VIVO

### 2.1. Diseño experimental

Los estudios *ex vivo* se realizaron en anillos de la aorta torácica extraída de los ratones Cre-lox tres semanas después del tratamiento con vehículo o tamoxifeno para producir la delección de ILK.

La aorta se cortó con ayuda de unas tijeras en finos anillos y fueron tratados, para estudiar la respuesta de la sGC (en su caso), con SNP ( $10^{-6}$  M durante 15 minutos) en la presencia o ausencia de su inhibidor ODQ (*1H-(1,2,4)Oxadiazolo(4,3-a)quinoxalin-1-one*; Sigma-Aldrich O3636,  $10^{-6}$  M durante 30 minutos), y para estudiar la respuesta de la PKG (en su caso), con el dibutilil-cGMP (*N<sub>2</sub>,2'-O-Dibutylguanosine 3',5'-cyclic monophosphate sodium salt hydrate* (1); Sigma Aldrich D3510,  $10^{-6}$  M durante 15 minutos) en la presencia o ausencia de su inhibidor DT3 (*Peptide-based inhibitor of protein kinase G*,  $10^{-6}$  M durante 30 minutos).

## 2.2. Técnicas empleadas

### 2.2.1. Análisis por Western Blot

Tras el tratamiento de los anillos se procedió a la extracción y determinación de los niveles proteicos de P-VASP y VASP total, proteínas sustrato de la vía NO-sGC-PKG, por western blot como ya se ha explicado anteriormente en el apartado 1.3.3.1.

### 2.2.2. Radioinmunoensayo (RIA)

Los anillos, antes del tratamiento, fueron lavados con medio de incubación (Tris 20 mM, NaCl 130 mM, KCl 5 mM, acetato sódico 10 mM, glucosa 5 mM y pH 7.45), e incubados en 1.5 mL de este medio con isobutylmethylxanthine 1 M (IBMX, inhibidor fosfodiesterasas) durante 15 minutos a 37 °C. Posteriormente se incubaron (en su caso) con el donador de NO, el SNP, en presencia y ausencia del ODQ, como se ha explicado en el diseño experimental.

Una vez finalizada la incubación se aspiró el medio de incubación y se añadió 1 mL de etanol al 65 %, a 4 °C, durante 30 min. De esta manera el cGMP difunde del anillo al etanol. Los anillos de aorta se secaron y pesaron para corregir los

resultados en función de la cantidad de tejido. El sobrenadante fue centrifugado durante 20 minutos a 3000 g y los extractos etanólicos se evaporaron en una centrifuga de vacío (Speed Vac). Los extractos secos se guardaron a -20 °C hasta el momento de realizar el RIA (Ruiz-Torres et al., 2008).

Los niveles de cGMP se determinaron a través de un RIA comercial de ( $[^{125}\text{I}]$ -cGMP radioimmunoassay; Amersham). Los extractos secos obtenidos se resuspendieron por agitación en tampón acetato (5 mM, pH 4.8). Las muestras y las soluciones patrones se distribuyeron en tubos (volumen final 150  $\mu\text{l}$ ) y se acetilaron añadiendo trietilamina (5  $\mu\text{l}$  / 100  $\mu\text{l}$  muestra) y anhídrido acético (2,5  $\mu\text{l}$  / 100  $\mu\text{l}$  de muestra), agitando después de cada adición. Seguidamente en cada tubo se añadieron 50  $\mu\text{l}$  de  $[^{125}\text{I}]$ -cGMP y posteriormente 50  $\mu\text{l}$  del anticuerpo de cGMP (*antiserum complex*).

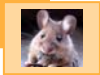
Después de 18 horas de incubación a 4 °C, se adicionó a cada tubo 500  $\mu\text{l}$  de tampón acetato. Al cabo de 15 minutos se centrifugaron los tubos a 4000 g durante 10 minutos y se eliminó el sobrenadante, se realizó el contaje de radiactividad presente en el pellet en un contador y de la instalación radiactiva. Todas las

determinaciones se realizaron por duplicado.

Los valores de radiactividad obtenidos se transformaron en moles de cGMP por interpolación en la curva estándar, ajustada mediante un programa de regresión no lineal a la ecuación, y corregido cada valor por el peso del anillo de aorta (Ruiz-Torres et al., 2008).

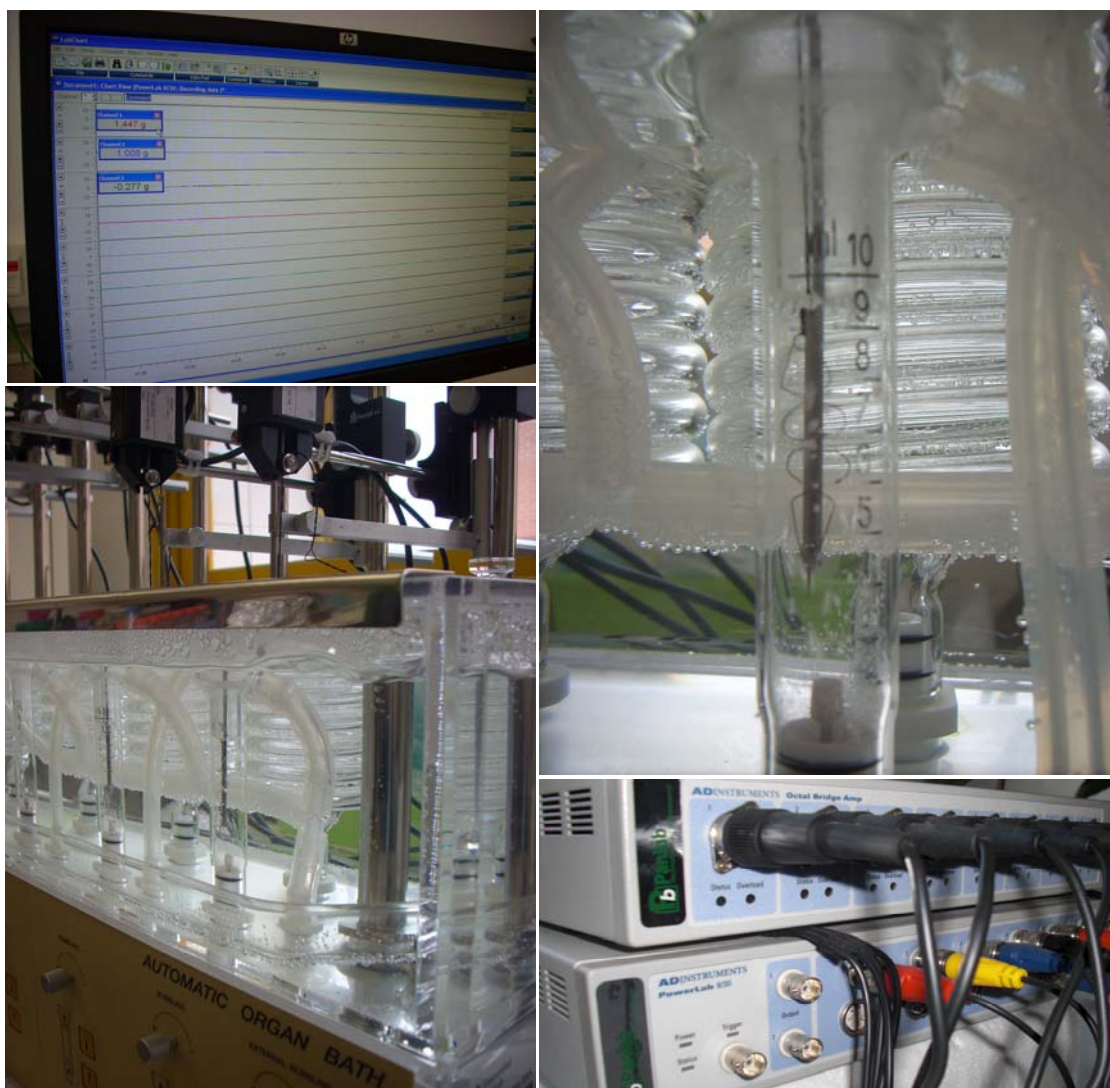
### 2.2.3. Reactividad vascular

Los anillos, antes del tratamiento, se introdujeron en solución de Krebs-Ringer bicarbonato (4.2 mM KCl, 1.18 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 120 mM NaCl, 1.2 mM  $\text{MgSO}_4$ , 1.3 mM  $\text{CaCl}_2$ , 5 mM  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ , 25 mM  $\text{NaHCO}_3$ , pH 7,4) y se dispusieron en una cámara entre dos soportes de acero, fijados a un bastón de vidrio y con un hilo atado al transductor de tensión (Automatic Organ Bath; Panlab S.L.). Las cámaras contenían 10 mL de solución Krebs a 37 °C, burbujeada con 5 % de  $\text{CO}_2$  en 95 % de  $\text{O}_2$  y pH 7.4. La calibración fue realizada utilizando una pesa de 1 g ajustando de esa manera la tensión basal a 1 g. Los transductores fueron conectados a amplificadores Panlab y la tensión fue registrada mediante un sistema de adquisición de datos (Figura 20).



Los anillos fueron estabilizados durante 40 minutos, tras los cuales se contrajeron con KCl 80 mM como control interno de respuesta, se lavaron 3 veces con Krebs, y se dejaron estabilizar otros 30 minutos. Pasado este tiempo se realizó un nuevo ajuste de tensión (1 g) y

seguidamente se contrajeron los anillos con noradrenalina  $3 \times 10^{-8}$  M, la relajación fue inducida con dosis crecientes de SNP ( $3 \times 10^{-8}$  -  $10^{-5}$  M) en el caso de la sGC y con dibutilil-cGMP, también con dosis crecientes ( $10^{-6}$  -  $10^{-3}$  M), para estudiar la vía de PKG (Ruiz-Torres et al., 2008).



**Figura 20. Aparato Reactividad Vascular.** Los anillos de aorta se colocan entre ambos ganchos metálicos dentro del bastón de vidrio y con un hilo se ajusta la tensión. La señal es recogida por el transductor y enviada a un ordenador para su registro.

3. ESTUDIOS IN VITRO

3.1. Cultivo primario de fibroblastos embrionarios de ratón

Los fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) fueron obtenidos de los embriones de ratones Cre-lox, Cre y Lox. Las hembras tras 14 días de gestación fueron sacrificadas por dislocación cervical, realizándose una laparotomía media ventral y extrayéndose los cuernos uterinos.

En condiciones de esterilidad (campana de flujo laminar) se procedió a la extracción de los embriones del saco embrionario. Cada embrión se llevó a una placa Petri de 35 mm, donde se homogeneizó con una pipeta en 1 mL de tripsina (200 mg/L; Lonza BE17-161E) y se incubó durante 15 minutos a 37 °C. Pasado este tiempo, la reacción se detuvo añadiendo medio de cultivo DMEM (Lonza BE12-604F) suplementado con peniestreptomocina (10000 U/mL penicilina – 10000 µg/mL estreptomocina; Gibco 15140-122), anfotericina B (250 µg/mL; Lonza 17-836E) y 10 % de suero fetal bovino (FBS, Foetal Bovine Serum; Gibco 10270-106) previamente descomplementado por calor (40 minutos a 60°C). Los homogeneizados se pasaron por filtros de 70mm (BD352350), se centrifugaron durante 5 minutos a 1200

rpm, y el pellet obtenido se resuspendió en medio de cultivo y fue sembrado en placas de 100 mm. Las células permanecieron a 37 °C en un incubador humidificado y con atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub> (Martínez-Salgado et al., 2006). Al llegar a confluencia, las células se tripsinizaron y se amplificaron para los distintos experimentos. Todos los experimentos se realizaron entre los pases 1 y 4.

La caracterización de los fibroblastos se realizó por microscopía, observándose la morfología característica de estas células, con prolongaciones citoplasmáticas y núcleos irregulares. No se apreciaron formas características de otros tipos celulares. Además, mediante inmunofluorescencia (Figura 21) y western blot, las células presentaron tinción positiva para α-actina (FITC conjugated; Sigma-Aldrich F3777) y colágeno IV (Santa Cruz SC-18177) y negativa para eNOS (BD Transductions 610269) y desmina (Sigma-

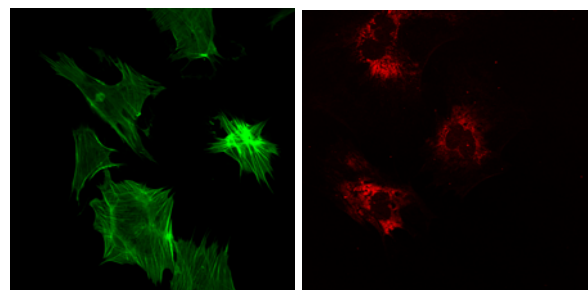
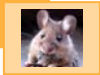


Figura 21. Inmunofluorescencia fibroblastos. Se muestra tinción positiva para α-actina (verde) y colágeno IV (rojo).



Aldrich D8281). Estas proteínas también fueron evaluadas por western blot. Los análisis se realizaron en comparación con homogeneizados de células endoteliales bovinas y células musculares lisas de rata para descartar su contaminación (datos no mostrados).

### 3.2. Diseño experimental

#### 3.2.1. Obtención de MEF knock-out para ILK

Los MEF fueron tratados con vehículo o con tamoxifeno para obtener la delección de ILK (MEF procedentes de ratones Cre-lox) o para descartar el impacto del tamoxifeno en los resultados obtenidos (MEF obtenidos de los animales Cre y de animales Lox). Se pesaron 4 mg de tamoxifeno (Sigma-Aldrich H6278) y se resuspendieron en 1 mL de etanol 100 % (1000  $\mu$ M) con ayuda de un sonicador (Model 250/450 Sonifier®, Branson Ultrasonics). El tratamiento consistió en la incubación de los MEF con tamoxifeno 1  $\mu$ M o con vehículo (etanol 10  $\mu$ L/mL) (Feil et al., 1996) durante 24 horas. Pasado este tiempo, se retiró el medio y se añadió medio fresco 48 horas más, para evitar la interferencia del tamoxifeno y para dar tiempo a la degradación de la proteína.

### 3.3. Técnicas empleadas

#### 3.3.1. Ensayo de inmunofluorescencia

Las células se sembraron en placas de 24 pocillos sobre cubreobjetos estériles de cristal (*Microscope Cover Glass* 12mm; ANAME 72231-01). Tras tratamiento con VH y TX durante 24 horas y periodo de recuperación de 48 horas, las células se lavaron 2 veces con PBS y fueron permeabilizadas y fijadas con metanol 100 % durante 10 minutos a -20 °C. Pasado este tiempo, se realizaron dos lavados de 5 minutos con PBS y se incubó durante 1 hora con la solución de bloqueo (PBS con BSA al 3 %). Después se lavaron dos veces con PBS y se incubó 1 hora con el anticuerpo primario ILK (1:100; Cell Signaling 3862) en solución de bloqueo. Tras dos lavados con PBS, se incubó con el anticuerpo secundario (*Rabbit Hilyte Fluor<sup>TM</sup> 647-labeled*, 1:1000; AnaSpec Inc). Para el montaje de las preparaciones se utilizó ProLong® (*Gold antifade Reagent with DAPI*, Invitrogen P36931), que lleva incorporado DAPI para la tinción de núcleos, se esperó a su secado y se almacenó a 4°C.

3.3.2. Herida *in vitro* y análisis del cierre

Para realizar estos experimentos se sembraron los MEF (Cre, Lox y Cre-lox) en placas de 6 pocillos. La mitad de la placa se trató con VH y la otra con TX. Pasadas 48 horas del tratamiento, se incubaron con medio DMEM sin suero de ternera durante 24 horas y después la monocapa se dañó artificialmente con una aguja (aproximadamente 0,6 mm de diámetro), seguido de dos lavados para retirar las células levantadas. Para ello, se dibujó por la parte posterior de la placa una cruz por pocillo y la herida se realizó a la derecha en paralelo al aspa vertical de la cruz (Figura 22). Las células se dejaron con medio al 0 % de suero y se estudió el cierre en ausencia o presencia de mitomicina C (10 µg/mL; Sigma-Aldrich M0503) que evita la proliferación. Para cuantificar el cierre de la herida se realizaron fotografías con cámara Moticom 480 (Motic® Microscopes) a distintos tiempos (2, 4, 6, 8, 24, 28, 32 horas después). Se midieron las áreas sobre las fotografías realizadas (Motic Image Plus 2.0 Software) y el porcentaje de cierre se calculó con la siguiente fórmula ( $1 - [\text{área actual herida} / \text{área inicial herida}] \times 100$ ).

Para los experimentos de cierre de herida en presencia de HGF humano (40 ng/mL; Miltenyi Biotec 130-093-871) se

trataron las células en el mismo momento de la realización de la herida. En el caso del inhibidor LY294002 (30 µM; Cell Signaling 9901) fue añadido 24 horas previas a la herida y de nuevo tras realizarla para que estuviera presente durante el cierre de la misma.

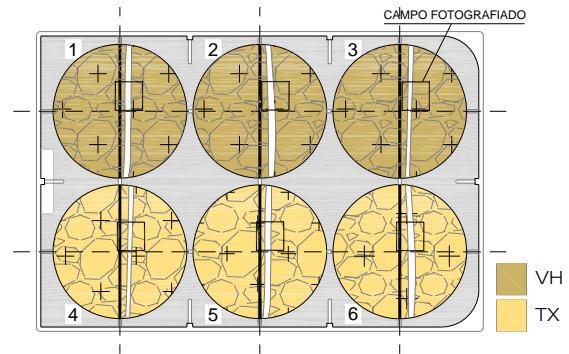
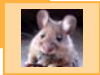


Figura 22. Realización de heridas en MEF. Se muestra una placa de 6 pocillos con la cruz dibujada y el campo fotografiado.

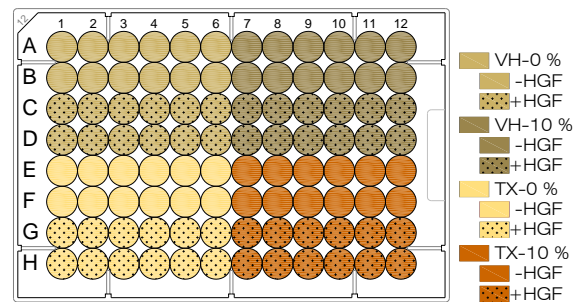
3.3.3. Determinación de la proliferación celular: ensayo WST1

Para estos experimentos se sembraron  $5 \times 10^4$  células / 100 µL medio / pocillo en placas de 96 pocillos. Pasadas las 48 horas del tratamiento con VH o TX, las células fueron privadas de suero durante 24 horas y transcurrido ese tiempo se retiró el medio y se dividió la placa en dos. A la primera mitad se añadió medio sin suero y a la segunda medio con suero al 10 % y se incubaron 24 horas. Pasado ese tiempo, se retiró el medio y se añadió nuevo medio



conteniendo 10  $\mu\text{L}$  / pocillo del reactivo WST-1 (Roche 05015944001) y se incubó durante 4 horas, tras las cuales la placa se agitó intensamente durante 1 minuto y se leyó en un espectrofotómetro de placas de ELISA a una longitud de onda de 450nm. La cuantificación de la proliferación se basa en la detección del color rojo oscuro formado por la transformación del reactivo WST-1 (sal de tetrazolio) en formazan, lo que directamente se correlaciona con el número de células metabólicamente activas en cultivo.

Para los experimentos de proliferación en presencia de HGF humano (Miltenyi Biotec 130-093-871) se trabajó con una concentración de 40 ng/mL y el tratamiento se añadió durante las 24 horas de crecimiento con y sin suero. El análisis de resultados se realizó (Figura 23) calculando el promedio de las absorbancias por grupo experimental y se calculó la proliferación por la fórmula: [promedio con suero – promedio sin suero] ó [promedio con suero con HGF – promedio sin suero con HGF], estableciéndose la comparación entre el VH y el tamoxifeno, con valor 1 para el primero y reflejando el TX como número de veces. Después se realizó la media sobre una n=3.



**Figura 23. Diseño experimento proliferación.** Se muestra una placa de 96 pocillos con la leyenda de los distintos tratamientos.



#### 4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de la media (EEM) de un número variable de experimentos (ver pies de figuras). En el caso de los ensayos de proliferación celular, cada valor aislado corresponde a la media de un sextuplicado y se muestra como el incremento de n-veces respecto al control (VH). Los cambios porcentuales se obtuvieron en cada experimento con respecto a su propio valor basal. En el caso de las tinciones de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia, se muestran una imagen como resultado representativo de varios experimentos.

Para los análisis paramétricos de dos grupos de resultados se utilizó el test de t de Student para datos pareados o no pareados, según el caso; para el análisis de múltiples grupos se utilizó el ANOVA de una o doble vía, seguido del test de rangos. Para los análisis no paramétricos se utilizaron U Mann-Whitney; para el análisis de múltiples grupos se utilizaron Friedman o Kruskal Wallis, para datos pareados o no pareados respectivamente. Una  $p < 0.05$  fue considerada estadísticamente significativa en todos los casos. Los análisis estadísticos se realizaron con el Software *Statgraphics Plus* (Statgraphics®).

---

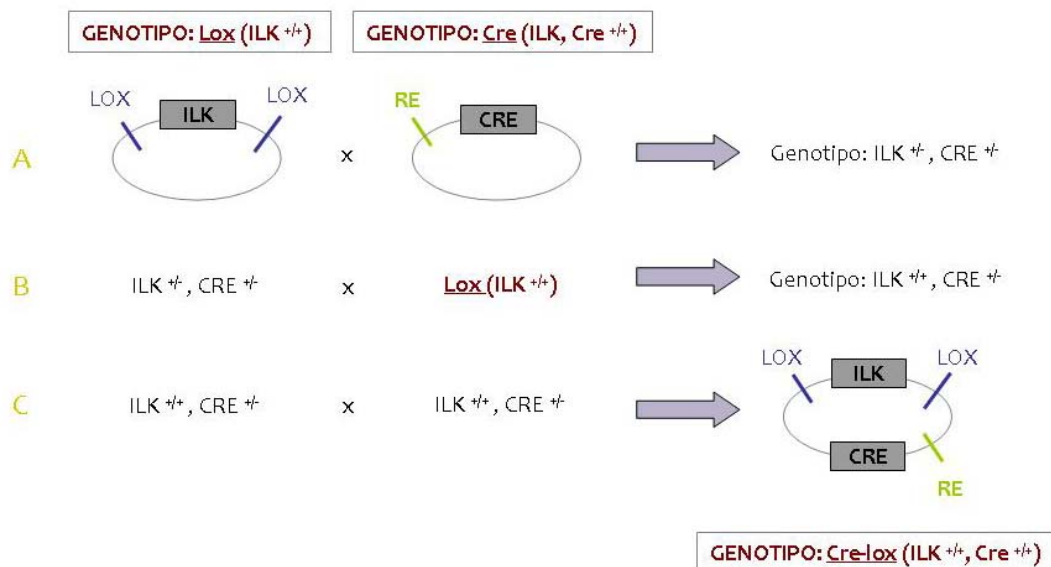
## Resultados

## 1. GENERACIÓN DEL MODELO EXPERIMENTAL KNOCK-OUT CONDICIONAL DE ILK EN RATONES CRE-LOX

La delección de ILK en el ratón resulta letal durante la embriogénesis (Sakai et al., 2003), por lo que para estudiar su papel en el ratón adulto es necesaria la realización de deleciones condicionales. El Dr. Shoukat Dedhar (British Columbia University, Vancouver, Canada) generó un ratón con el gen de ILK flanqueado por las secuencias **Lox** (ILK<sup>+/+</sup>) que nos ha cedido (Terpstra et al., 2003). El ratón transgénico Cre fue cedido por el Dr. Miguel Torres (CNIC, Centro Nacional de Investigaciones

Cardiovasculares, Madrid). Estos ratones portan el gen para la recombinasa (**Cre**) unido al receptor de estrógenos mutado (Cre-RE).

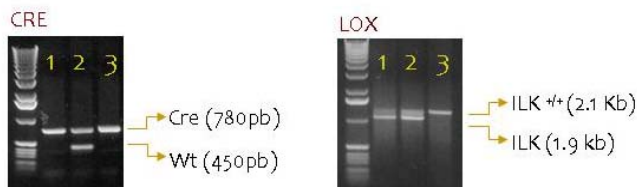
Se cruzaron estos ratones obteniendo un genotipo ILK<sup>+/-</sup> y Cre<sup>+/-</sup> y posteriormente se realizó un retrocruzamiento con los parentales ILK<sup>+/+</sup> obteniendo el genotipo ILK<sup>+/+</sup> y Cre<sup>+/-</sup>. Para mayor facilidad de manipulación y mayor aprovechamiento de recursos se buscó la homocigosis también para Cre, de manera que estos últimos ratones se cruzaron entre sí hasta obtener el ratón **Cre-lox** (ILK<sup>+/+</sup>, Cre<sup>+/-</sup>) adecuado para la delección de ILK (Figura 24).



**Figura 24. Esquema obtención ratones con genotipo Cre-lox.** (A) Los ratones Lox se cruzan con los Cre. Se obtienen los ILK<sup>+/-</sup>, Cre<sup>+/-</sup> que se (B) retrocruzan con los Lox parentales para obtener la homocigosis de Lox. (C) De este nuevo cruce se cruzan entre sí hasta obtener también la homocigosis para Cre.



El genotipo de cada ratón fue controlado mediante PCR del ADN extraído de la cola una semana después del destete (Figura 25).



**Figura 25. Genotipado ratones.** Izquierda genotipado ratones Cre: carril 1 y 3 homocigotos, carril 2 heterocigoto. Derecha genotipado ratones Lox: carril 1 y 2 heterocigoto, carril 3 homocigoto.

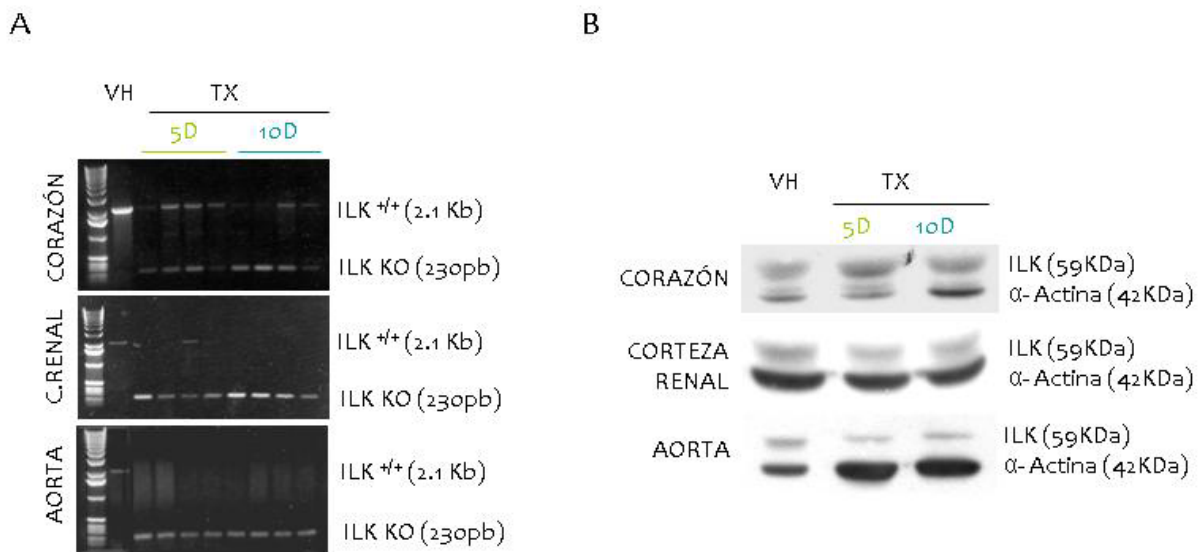
### 1.1. Pautas de administración del 4-OH-tamoxifeno.

El transgen Cre está fusionado con una forma mutada del receptor de estrógenos (ER, *Estrogen Receptor*). De esta manera el receptor no se unirá a su ligando natural, el beta estradiol, sino a un ligando sintético el 4-OH-tamoxifeno (TX) (Indra et al., 1999). En ausencia de ligando, Cre-ER se localiza en el citoplasma y se encuentra unido a la proteína de choque térmico Hsp90 (*Heat Shock Protein*); de este modo Cre es inactivo. Tras la administración de tamoxifeno, Hsp90 es desplazado por el TX, uniéndose al ER en su lugar. Esto causa la translocación de esta proteína de fusión al

núcleo, induciéndose la actividad de Cre (Tian et al., 2006).

Para la preparación del tamoxifeno, se resuspendió el contenido del vial (50 mg) en aceite de maíz: etanol (1:9) y se sonicó hasta obtener la total transparencia, obteniendo una concentración de 5 mg/mL (solución stock). Se realizaron alícuotas de 2 mL que se guardaron a -20 °C hasta su uso. La administración del TX al ratón se hizo por inyección intraperitoneal.

Los animales se comenzaron a tratar con **1 mg diario de TX durante 5 días** consecutivos (Indra et al., 1999). Los animales se sacrificaron en el último día de tratamiento (5 días) y cinco días después (10 días). Se extrajeron proteínas de distintos tejidos, aorta, corazón y corteza renal, para el estudio de la expresión de la proteína mediante western blot y se comprobó la delección del gen de ILK por PCR de Lox. Se observó de esta manera que la delección del gen en tejidos como el corazón no era completa (Figura 26A). Además, se encontró una ligera disminución de la proteína en el caso de la aorta, pero en otros tejidos no hubo modificaciones (Figura 26B).



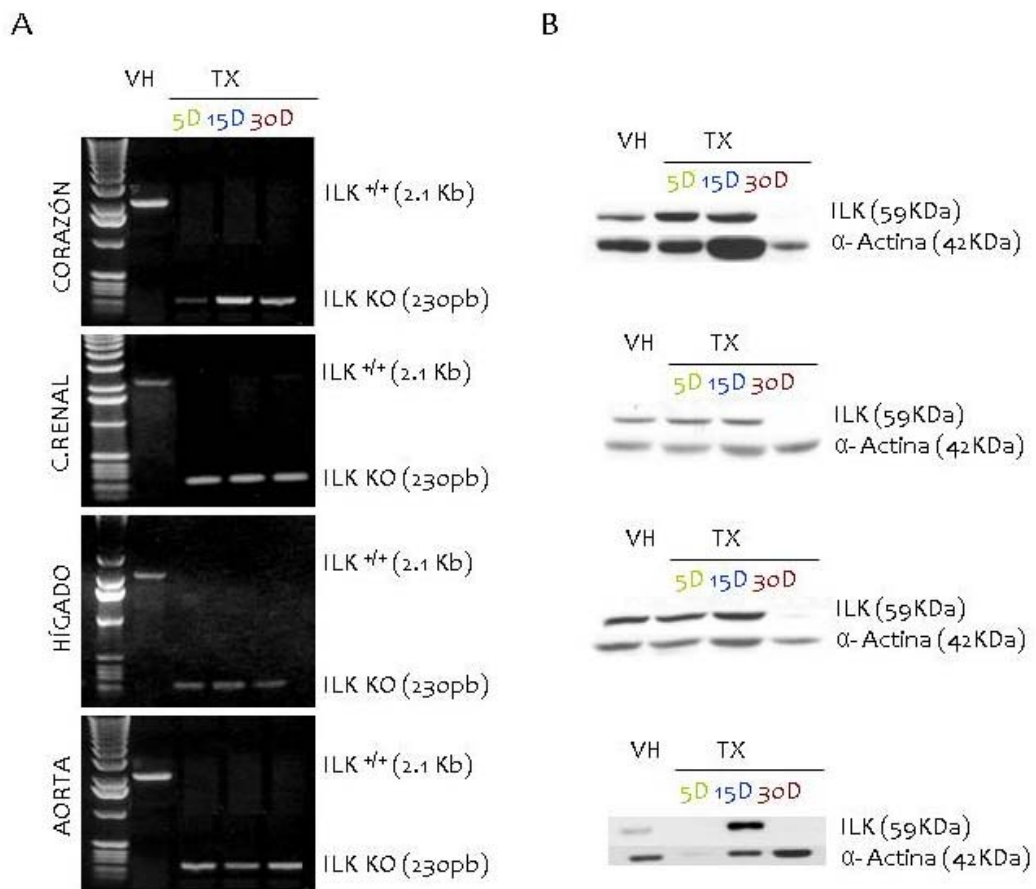
**Figura 26.** Expresión de ILK tras tratamiento con 1 mg/día de tamoxifeno, durante 5 días consecutivos y sacrificio a los 5 días (5D) y 10 días (10D) tras el inicio del tratamiento. (A) Análisis de la delección de ILK por PCR en los distintos tejidos. La banda de 2.21 Kb se corresponde con ILK intacta y la de 230 pb con el fragmento que queda tras la escisión de ILK. (B) Expresión de la proteína ILK por western blot en los distintos tejidos y días de sacrificio. Se muestra  $\alpha$ -actina como control de carga. No existen diferencias significativas, n=6 por grupo experimental.

Esto nos llevó a pensar que la concentración de TX no era la suficiente para la completa delección. Por lo que se iniciaron nuevos grupos en los que por un lado se aumentó el **tiempo a 7 días** sin cambios significativos (datos no mostrados) y por otro, la **dosis a 1.5 mg**.

El aumento de la dosis se acompañó con el sacrificio de animales a tiempos más prolongados barajando la idea de que la proteína necesitase más tiempo para ser degradada y ver, de ese modo, una clara disminución en sus niveles. En estos experimentos se analizó, de nuevo, la presencia del gen por PCR en los distintos tejidos y a distintas fechas de sacrificio

desde el quinto día hasta completado el mes para analizar de manera progresiva la evolución de la proteína. La delección fue completa en los distintos tejidos estudiados (Figura 27A) y en el análisis de la proteína, se encontraron diferencias significativas a los 30 días desde el inicio del tratamiento (Figura 27B).

A la vista de los resultados se fijaron, por tanto, como condiciones 1.5 mg de TX (300  $\mu$ L del stock) al día durante 5 días consecutivos y se esperaron 3 semanas para trabajar con el ratón. En el vehículo (VH) se administraron 300  $\mu$ L de aceite de maíz:etanol (9:1).



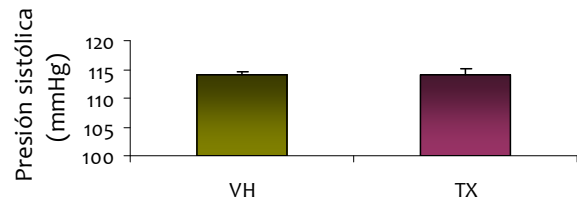
**Figura 27. Expresión de ILK tras tratamiento con 1.5 mg/día de tamoxifeno, durante 5 días consecutivos y sacrificio a los 5 días (5D), 15 días (15D) y 30 días (30D) tras el inicio del tratamiento. (A) Análisis de la delección de ILK por PCR en los distintos tejidos. La banda de 2.21 Kb se corresponde con ILK intacta y la de 230 pb con el fragmento que queda tras la escisión de ILK. (B) Expresión de la proteína ILK por western blot en los distintos tejidos y días de sacrificio. Se muestra  $\alpha$ -actina como control de carga. Disminución significativa en todos los tejidos estudiados a los 30 días del sacrificio vs VH, n=6 por grupo experimental.**

2. DÉFICIT DE ILK Y FUNCIÓN VASCULAR

2.2. Consecuencias del déficit de ILK

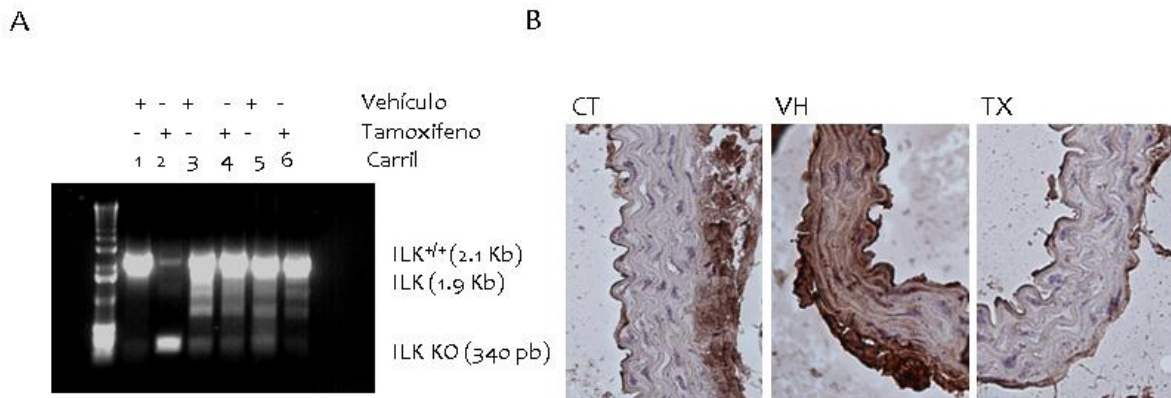
2.1. Expresión de ILK en aorta de ratones Cre-lox tratados con tamoxifeno

Los ratones Cre-lox fueron tratados con VH o TX según la pauta de administración previamente fijada. Como control, ratones de las cepas parentales Cre y Lox fueron sometidos al mismo tratamiento. La delección del gen de ILK en aorta se comprobó en todos los ratones por PCR (Figura 28A). Además, por inmunohistoquímica, se observó una marcada disminución de la proteína (Figura 28B).

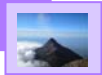


**Figura 29. Medidas presión arterial sistólica.** La presión arterial se analizó por esfigmomanómetro de cola. Los resultados son la media  $\pm$  error estándar de la media de 12 animales por grupo.

En primer lugar se midió la presión arterial en animales deficientes en ILK, no observándose diferencias significativas con respecto a los controles (Figura 29).



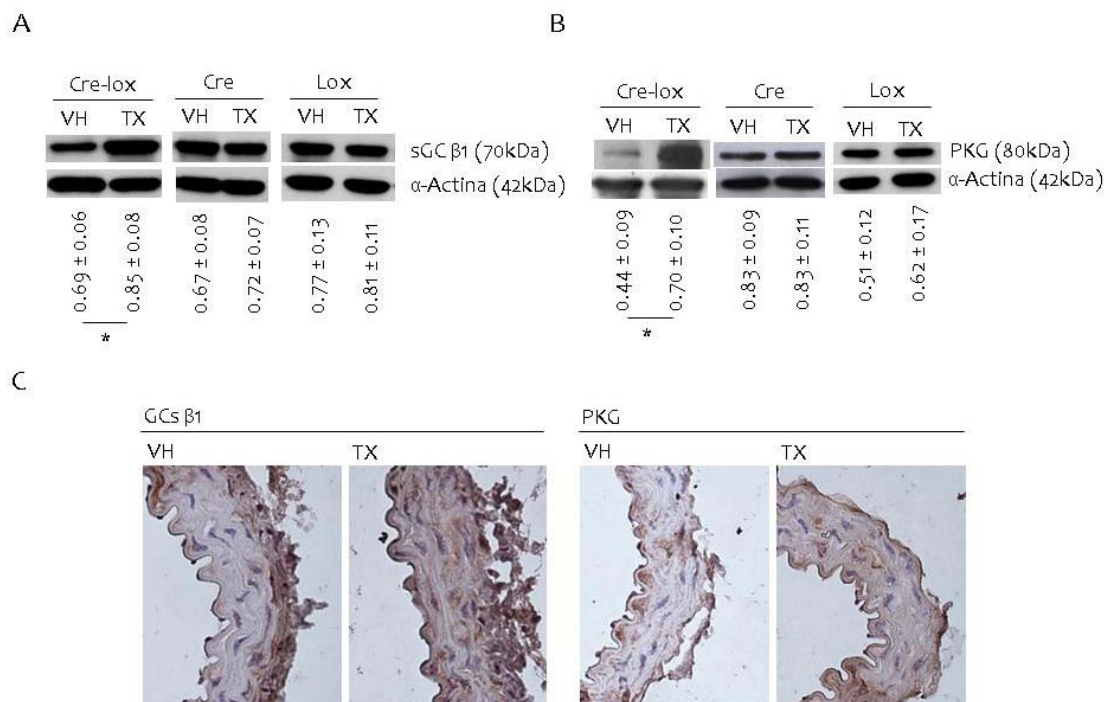
**Figura 28. Delección condicional de ILK en aorta.** (A) Delección de ILK en aorta analizada por PCR tras tratamiento con vehículo (VH) o tamoxifeno (TX). Carriles 1-2: ratones Cre-lox; carriles 3-4: ratones Lox; carriles 5-6: ratones Cre. (B) Inmunohistoquímica de ILK en la aorta de animales Cre-lox tratados con VH (ILK intacta) y TX (deficientes en ILK). CT representa el control negativo de la técnica.



La consecuencia más importante de la deficiencia de ILK en aorta fue un aumento en dos proteínas relacionadas con la reactividad vascular al NO, la guanilato ciclasa soluble (sGC, *soluble Guanylyl Cyclase*) y la proteína quinasa G (PKG, *Protein Kinase G*). Ambos aumentos fueron comprobados por western blot e inmunohistoquímica. Los animales Cre y Lox tratados con TX no presentaron estos aumentos, excluyendo así un posible efecto intrínseco del tamoxifeno (Figura 30).

### 2.3. Respuesta al óxido nítrico y a análogos del cGMP *in vivo* y *ex vivo*

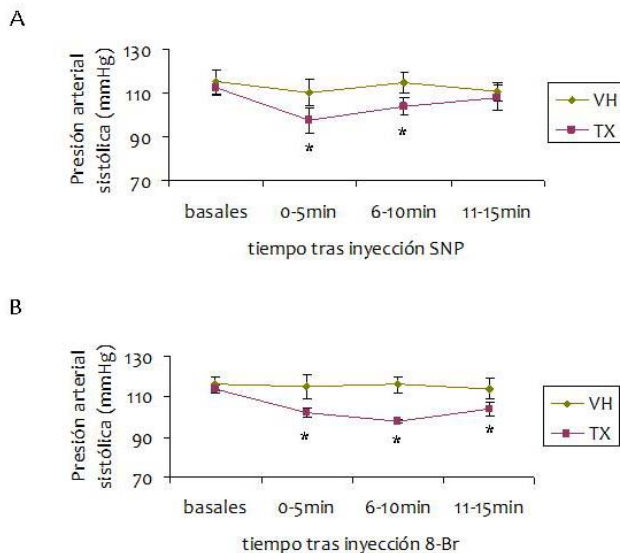
Para estudiar las consecuencias funcionales de estos cambios, se analizó el efecto sobre la tensión arterial de la administración de agonistas de la sGC y de la PKG. Para ello se tomaron las medidas de presión sistólica de ratones Cre-lox tratados con VH o TX antes y durante los 15 minutos siguientes a la administración intraperitoneal de dosis no hipotensoras de un donador de NO, el SNP, para explorar la



**Figura 30. Consecuencias de la delección condicional de ILK en aorta.** (A y B) Expresión de sGC (A) y PKG (B) analizada por western blot en aortas aisladas de ratones Cre-lox, Cre y Lox tratados con vehículo (VH) o tamoxifeno (TX). Los valores que aparecen bajo las bandas son la media  $\pm$  error estándar de la media de los valores densitométricos corregidos para el control de carga ( $\alpha$ -actina) de 8 animales por grupo. \* $p < 0.05$  vs VH. (C) Expresión de las proteínas sGC y PKG por inmunohistoquímica en aortas extraídas de animales Cre-lox tratados con VH o TX.



vía de la sGC (Figura 31A), o de un análogo de GMP cíclico, 8-Br-GMP cíclico, para explorar la de PKG (Figura 31B). Los resultados mostraron que, en ambos casos, a las dosis utilizadas, no existe prácticamente descenso en la presión sistólica de los animales tratados con VH mientras que sí lo hay en los animales tratados con TX, por tanto deficientes en ILK.

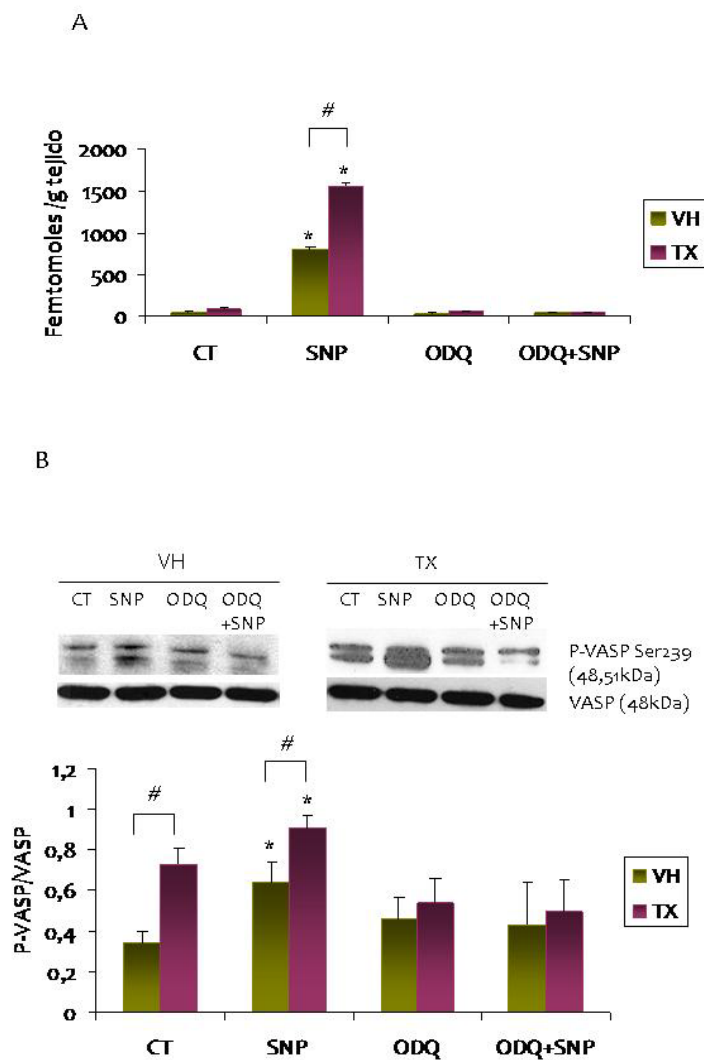
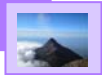


**Figura 31. Medidas de presión sistólica tras la inyección de dosis no hipotensoras de nitroprusiato sódico (0.5 µg/Kg, SNP) y 8-bromo cGMP (1 µg/kg, 8-Br).** La presión sistólica se analizó mediante un esfigmomanómetro de cola en animales Cre-lox tratados con vehículo (VH) o tamoxifeno (TX). (A y B) Medida de la presión sistólica en intervalos de 5 minutos tras la administración de SNP (A) o 8-Br (B). Los resultados son la media ± error estándar de la media de 6 animales por grupo. \*p<0.05 vs basales.

A continuación, para realizar un estudio en profundidad de la estimulación de ambas vías, se utilizaron anillos de aorta extraídos de animales Cre-lox previamente tratados con VH o TX.

Los anillos fueron incubados en un medio que contenía SNP analizándose la producción de cGMP mediante RIA. Algunos de estos anillos fueron previamente tratados con el inhibidor de la sGC, el ODQ. Los resultados mostraron que los animales tratados con TX producían una mayor cantidad de cGMP, tanto basalmente como en respuesta al SNP respecto a los tratados con VH, quedando esta producción inhibida al usar ODQ (Figura 32A).

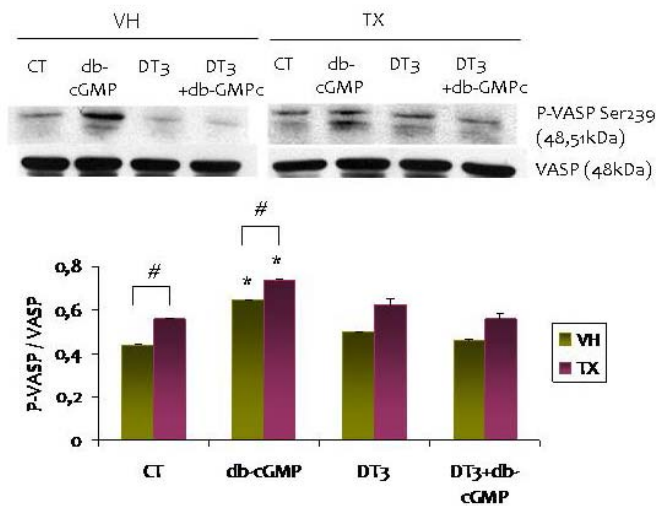
En estos mismos anillos, se analizó por western blot la fosforilación de uno de los sustratos de PKG, VASP (*Vasodilator-stimulated Phosphoprotein*), observándose que SNP aumenta la fosforilación de VASP en ambos grupos experimentales, siendo mayor en las aortas procedentes de animales tratados con TX. Ya incluso a nivel basal la fosforilación en este grupo es mayor. El aumento queda bloqueado en presencia de ODQ (Figura 32B).



**Figura 32. Análisis de la activación de la sGC.** (A) Medida de la síntesis de cGMP por RIA en anillos de aorta extraídos de ratones Cre-lox tratados con vehículo (VH) o tamoxifeno (TX) y tratados con nitroprusiato sódico ( $10^{-6}$  M durante 15 minutos, SNP) en presencia o ausencia de 1H-(1,2,4)Oxadiazolo(4,3-a)quinoxalin-1-one ( $10^{-6}$  M durante 30 minutos, ODQ). La gráfica representa la media  $\pm$  error estándar de la media de 6 experimentos diferentes. \* $p < 0.05$  vs CT. # $p < 0.05$  vs VH. (B) Medida de la fosforilación de VASP por western blot en proteínas aisladas de anillos de aortas de ratones Cre-lox tratados con vehículo (VH) o tamoxifeno (TX) y tratadas con SNP ( $10^{-6}$  M durante 15 minutos, SNP) en presencia o ausencia de ODQ ( $10^{-6}$  M durante 30 minutos). La gráfica representa la media  $\pm$  error estándar de la media de los valores densitométricos corregidos para VASP total de 6 experimentos diferentes. \* $p < 0.05$  vs CT. # $p < 0.05$  vs VH. Se muestra un blot representativo en cada caso.

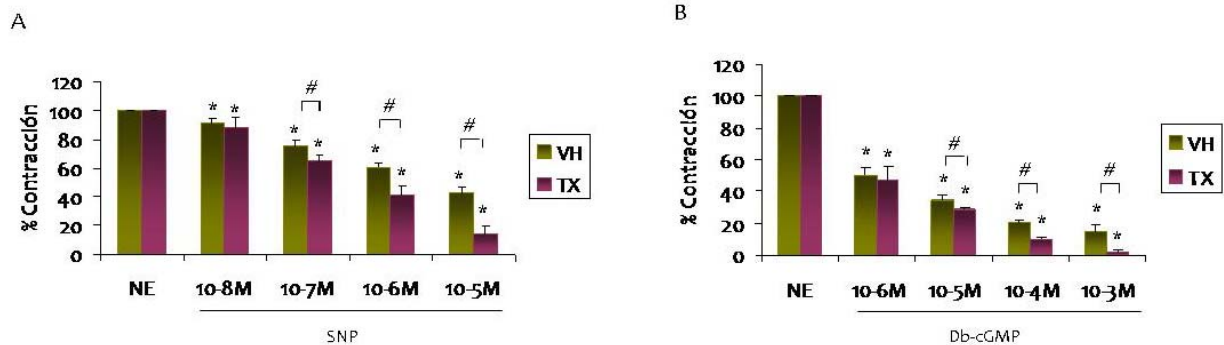
La fosforilación de VASP fue analizada también en presencia de dibutiril-cGMP, un agonista de la PKG, para estudiar la respuesta debida a esta proteína. Como

antagonista se usó el DT3, añadido a algunos anillos 30 minutos antes del dibutiril-cGMP. De nuevo la fosforilación de VASP fue mayor en los animales tratados con TX (Figura 33).



**Figura 33. Análisis de la activación de PKG.** Medida de la fosforilación de VASP por western blot en proteínas de aortas procedentes de animales Cre-lox tratados con vehículo (VH) o tamoxifeno (TX), tras el tratamiento con dibutiril-cGMP ( $10^{-6}$  M durante 15 minutos, db-cGMP) en la presencia y ausencia de DT3 ( $10^{-6}$  M, 30 minutos, inhibidor de PKG). La gráfica representa la media  $\pm$  error estándar de la media de los valores densitométricos corregidos para VASP total de 6 experimentos diferentes. \* $p < 0.05$  vs CT. # $p < 0.05$  vs VH. Se muestra un blot representativo en cada caso.

Para analizar el efecto directo de la falta de ILK en la pared vascular sobre la contracción vascular se aislaron anillos de aorta de ratones Cre-lox tratados con VH o TX. Los anillos se trataron previamente con norepinefrina (NE) para promover la máxima vasoconstricción y se fueron registrando las fuerzas mecánicas a concentraciones crecientes del agonista de la sGC (Figura 34A) y del agonista de PKG (Figura 34B). Se observó que los anillos de aorta procedentes de ratones TX tienen una mayor respuesta vasodilatadora ante ambos agonistas.



**Figura 34. Estudio de la respuesta contráctil en anillos de aorta.** Las gráficas muestran el porcentaje de contracción en anillos de aorta de ratones Cre-lox tratados con vehículo (VH) o tamoxifeno (TX), considerando el tratamiento con norepinefrina (NE,  $3 \times 10^{-8}$ ) como el 100 %. La vasodilatación se induce con concentraciones crecientes de nitroprusiato sódico (SNP, panel A) o dibutiril cGMP (db-cGMP, panel B). Los resultados son la media  $\pm$  error estándar de la media de 6 experimentos diferentes. \* $p < 0.05$  vs CT. # $p < 0.05$  vs VH.

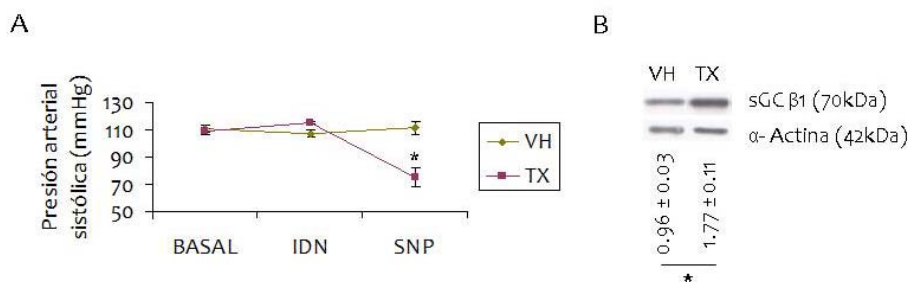
#### 2.4. Implicaciones del déficit de ILK en condiciones fisiopatológicas

Para analizar la importancia del déficit de ILK en circunstancias fisiopatológicas, se indujo en primer lugar una sensibilización al NO en los ratones, efecto conocido como taquifilaxia.

Para inducir la tolerancia se administró dinitrato de isosorbide (IDN) a los ratones Cre-lox, previamente tratados con VH o con TX, durante 1 semana en el agua de bebida. Tras el tratamiento, se midió la presión arterial de los ratones e, inmediatamente después, se inyectó intraperitonealmente SNP analizándose los cambios producidos en la presión arterial sistólica del ratón durante los siguientes 15 minutos. En los

ratones deficientes en ILK se produjo un descenso significativo de la presión arterial en respuesta a SNP aún habiendo recibido un tratamiento crónico con donadores de NO, mientras que los animales con ILK intacta no responden a SNP tras inducirles la tolerancia a los donadores de NO (Figura 35A). El contenido proteico de sGC en las aortas de los estos animales se midió por western blot tras el sacrificio. Los ratones Cre-lox TX mantienen una expresión proteica de la sGC elevada frente a los VH (Figura 35B).

En otro grupo de ratones, se evaluó el efecto de la delección de ILK en un modelo de hipertensión aguda provocada por la inyección intraperitoneal de una sola dosis de angiotensina II.

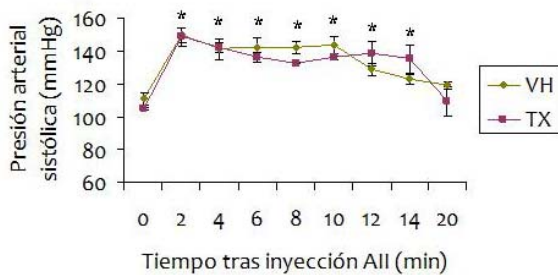


**Figura 35. Medidas de la presión sistólica tras tratamiento con nitroprusiato sódico (2 µg/Kg, SNP) en animales con taquifilaxia.** Los animales Cre-lox tratados con vehículo (VH) o tamoxifeno (TX) se trataron durante una semana con dinitrato de isosorbide (300 mg/Kg/día durante una semana, IDN) para inducir tolerancia al NO. Posteriormente se trataron con SNP. (A) La presión sistólica se analizó por esfigmomanómetro de cola al inicio del experimento (basal), tras una semana de tratamiento con el donador de NO (IDN) y la obtenida en los 15 minutos siguientes a la administración i.p. de SNP (2 µg/Kg). Los resultados son la media ± error estándar de la media de 6 animales por grupo. \*p<0.05 vs basal. (B) El contenido proteico de sGC en la aorta de estos animales se analizó por western blot tras el experimento. Los valores que aparecen bajo las bandas son la media ± error estándar de la media de los valores densitométricos corregidos para el control de carga (α-actina) de 6 animales por grupo. \*p<0.05 vs VH.

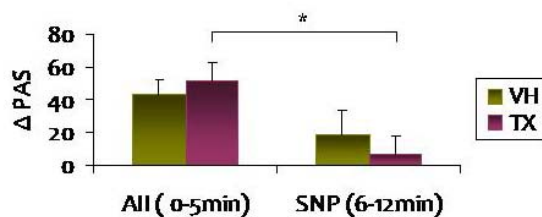
Se realizó, en primer lugar, una curva de tiempo-respuesta analizando los valores de presión sistólica, comprobando que la máxima respuesta hipertensora, tanto en los animales tratados con VH como con TX, tenía lugar en los 2 primeros minutos tras la administración y que el aumento en la presión sistólica se mantenía aproximadamente unos 17 minutos más (Figura 36A).

Seguidamente, en otro grupo de animales se administró SNP 5 minutos después de la inyección de AII analizándose los valores de presión sistólica en los seis minutos siguientes. Los resultados mostrados en la Figura 35B indican que sólo los ratones deficientes en ILK mostraron un descenso significativo de la presión arterial en respuesta a los donadores de NO en una situación de hipertensión aguda (Figura 36B).

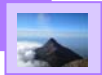
A



B



**Figura 36. Medidas presión sistólica tras tratamiento con nitroprusiato sódico (2 µg/Kg, SNP) en animales con hipertensión inducida con angiotensina II (AII).** (A) Medida de la presión sistólica analizada por esfigmomanómetro de cola en los animales Cre-lox tratados con vehículo (VH) o tamoxifeno (TX) tras inyección i.p. de 0.8 µg/Kg de AII agrupados en bloques de 2 minutos. Los resultados son la media ± error estándar de la media de 6 animales por grupo. \*p<0.05 vs t=0 para ambos grupos. (B) Medida de la presión sistólica en los animales Cre-lox VH o TX tratados con AII (0-5 minutos) y posteriormente con SNP (6-12 minutos). Los resultados son la media ± el error estándar de la media del incremento de la presión arterial sistólica (ΔPAS) con respecto al basal de 6 animales por grupo. \*p<0.05 vs AII.



### 3. DÉFICIT DE ILK Y MECANISMOS DE REPARACIÓN TISULAR

Para estudiar la importancia de ILK en la reparación de tejidos se utilizó el modelo de herida cutánea dado su fácil acceso.

#### 3.1. Expresión de ILK en piel de ratones Cre-lox tratados con tamoxifeno

Los ratones fueron tratados con vehículo o tamoxifeno según las pautas de administración fijadas previamente. En primer lugar, se comprobó la eficacia del tamoxifeno en piel. Se realizó para ello una PCR de la piel en todos los ratones, confirmando la delección de ILK en los Cre-lox tratados con TX (Figura 37A). Por inmunohistoquímica, con un anticuerpo específico para ILK, se observó una reducción significativa de los niveles proteicos en la piel de los Cre-lox TX (Figura 37B).

A



B



**Figura 37. Delección condicional de ILK en piel.** (A) Expresión de ILK en piel analizada por PCR tras el tratamiento con vehículo (VH) o tamoxifeno (TX). Carriles 1-4: ratones Cre-lox; carriles 5-8: ratones Lox; carriles 9-12: ratones Cre. (B) Inmunohistoquímica de ILK en piel de animales Cre-lox tratados con VH o TX. CT representa el control negativo de la técnica.

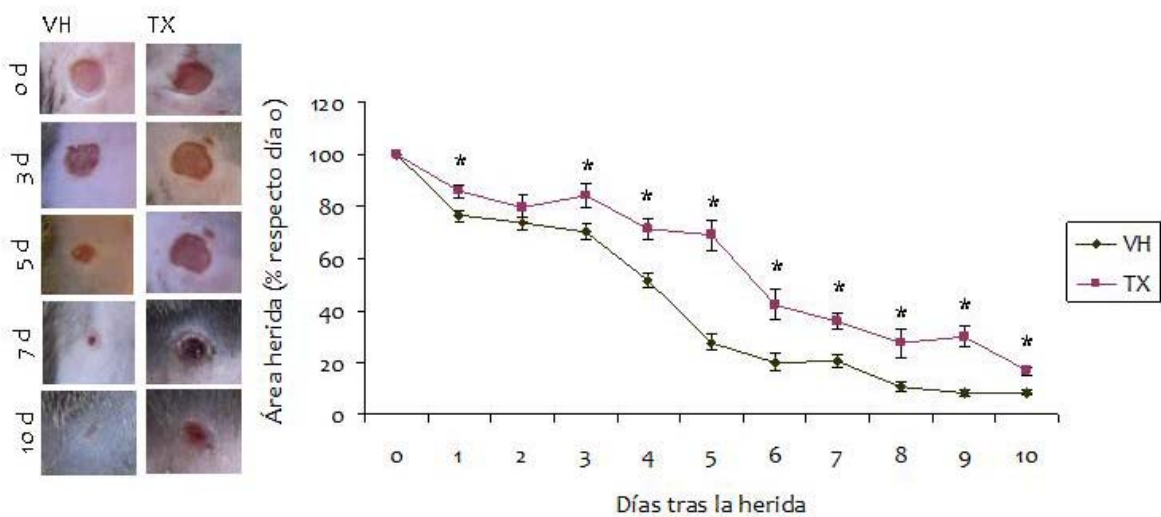
### 3.2. Cierre herida *in vivo*

Las heridas se realizaron en los animales Cre-lox tratados con VH o TX según se describe en el Material y Métodos.

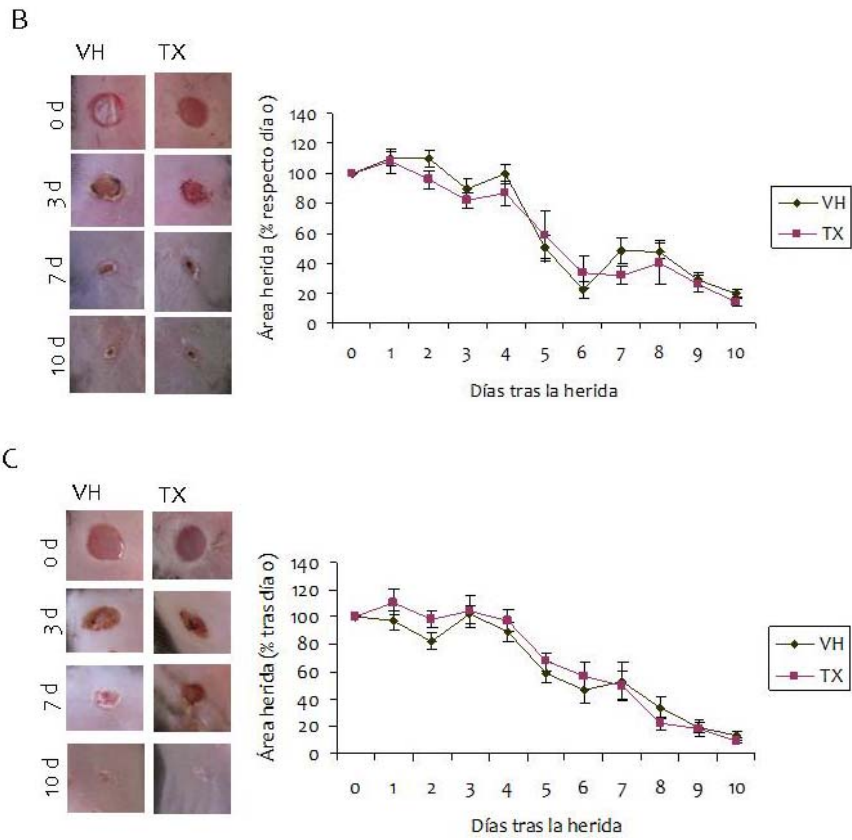
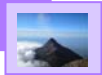
Para cuantificar la velocidad del cierre de la herida se tomaron medidas del área cada día, desde el día de la herida (considerado día 0) hasta 10 días después. Se observó que los ratones deficientes en ILK presentaban un enlentecimiento en el

cierre de la herida con respecto a los animales con ILK intacta (Figura 38A). Los mismos experimentos se realizaron en paralelo con los animales controles, los animales Cre (Figura 38B) y los Lox (Figura 38C) tratados con VH o TX, para descartar la posibilidad de que el tamoxifeno estuviera influyendo en el proceso de cierre de la herida. En ningún caso se observaron diferencias significativas en cuanto a la cinética del cierre de las heridas, descartándose así un efecto intrínseco del tamoxifeno.

A



**Figura 38. Cinética del cierre de las heridas en piel.** (A) Cinética del cierre de herida en animales Cre-lox tratados con vehículo (VH) o tamoxifeno (TX). Los resultados son la media ± error estándar de la media del porcentaje del cierre monitorizado durante 10 días de 8 animales por grupo. \*p<0.05 vs VH.



**Figura 38. Cinética del cierre de las heridas en piel.** (B y C) Cinética cierre herida en animales Cre (B) y Lox (C) tratados con VH o TX. Los resultados son la media  $\pm$  error estándar de la media de 8 animales por grupo. En cada caso se muestra un experimento representativo.



Se realizaron tinciones de hematoxilina / eosina en cortes histológicos a distintos días de las heridas realizadas en los ratones Cre-lox VH y TX para estudiar las posibles diferencias estructurales. El estudio confirmó las diferencias existentes entre el VH y el TX, observándose una marcada alteración en la cicatrización de los ratones TX muy ostensible desde el día 3, con alteraciones tanto en la reepitelización de la herida como en la aparición en su fondo de tejido de granulación definido por la presencia de vasos neoformados, fibroblastos y un infiltrado inflamatorio que rápidamente progresó hacia su sustitución por tejido conjuntivo fibroso.

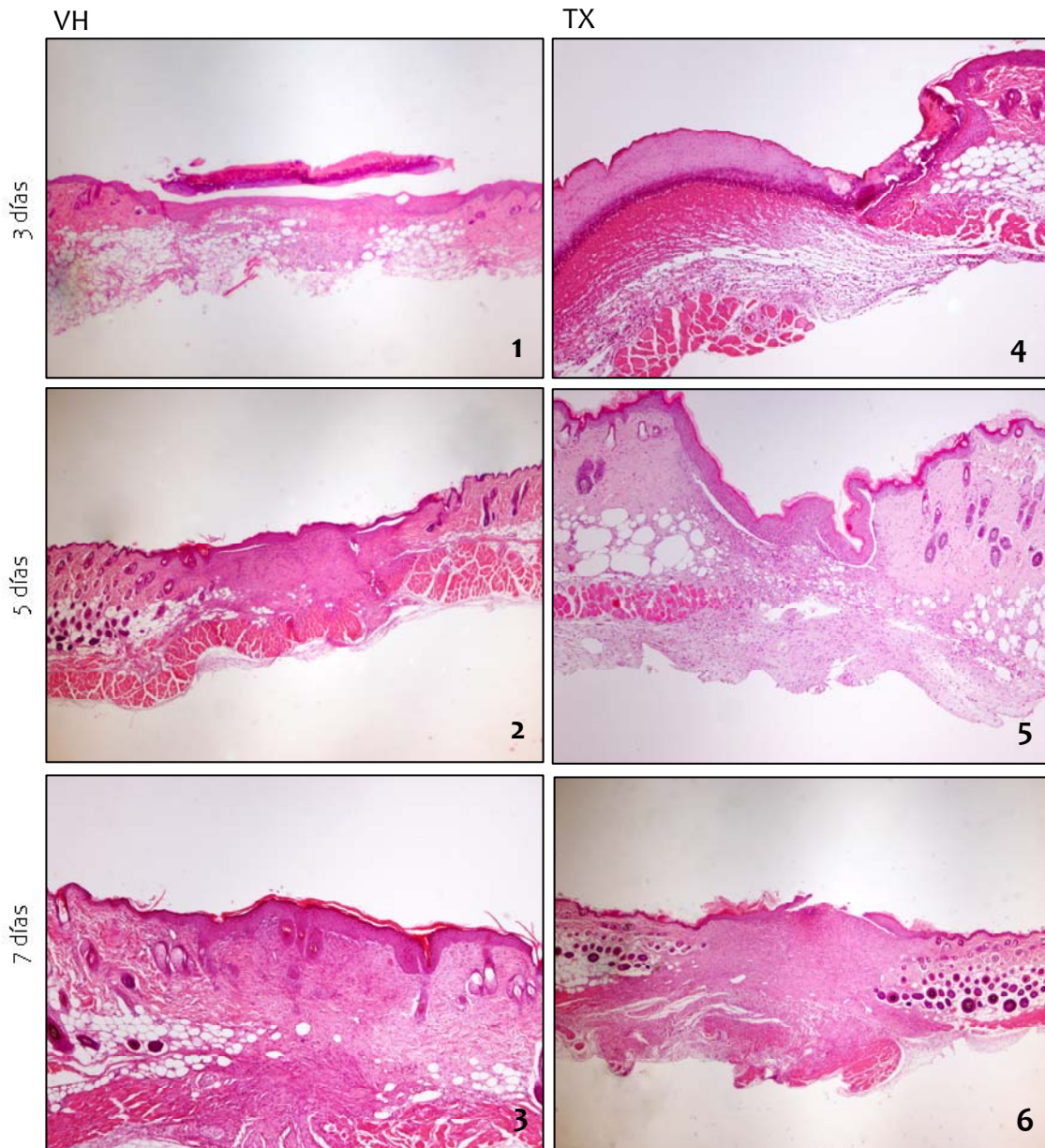
En la [Figura 39A](#) la columna izquierda muestra un animal tratado con VH, donde se aprecia desde el tercer día una reepitelización casi total de la herida bajo la capa de células necróticas desprendida durante el procesamiento histológico con presencia de tejido de granulación (1) que rápidamente progresa hacia tejido conjuntivo denso escasamente neovascularizado con evidente remodelación colágena (2 y 3). En la columna de la derecha, correspondiente a un animal tratado con TX, la reepitelización se encuentra muy retrasada, de forma que se produce una persistencia del recubrimiento fibrinoso de la herida (4) que

al final del seguimiento contiene mucha mayor proporción de capilares y células que en los animales control y apenas muestra remodelación (5 y 6).

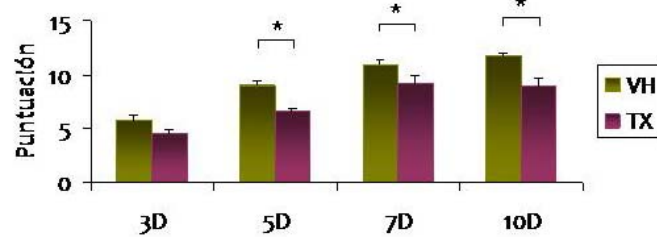
Se realizó un análisis cuantitativo de estas diferencias con la puntuación de [Greenhalgh et al. 1990](#). El retraso en la reepitelización fue significativo desde el día 5 ([Figura 39B](#)).



A



B

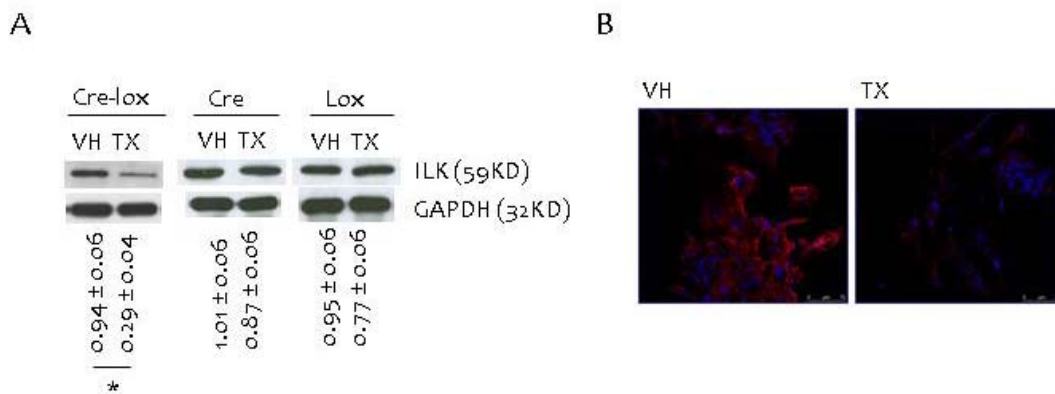


**Figura 39. Estudio histológico.** (A) Tinción hematoxilina / eosina en secciones de heridas de ratones Cre-lox tratados con vehículo, VH (1-3), o tamoxifeno, TX (4-6), a distintos días de cicatrización 3 días (1 y 4), 7 días (2 y 5) y 10 días (3 y 6). (B) Valoración cuantitativa del proceso de cicatrización de acuerdo a la escala descrita por Greenhalgh et al. El gráfico muestra la media  $\pm$  error estándar de la media de las puntuaciones asignadas a heridas de 8 animales por grupo. \* $p < 0.05$  vs VH.

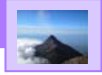
### 3.3. Cierre de herida *in vitro*

El estudio de los mecanismos implicados en la ralentización del cierre de la herida en ausencia de ILK se realizó utilizando fibroblastos embrionarios de ratón (MEF, *Mice Embryonic Fibroblast*) aislados a partir de los animales Cre-Lox, Cre y Lox. Una vez cultivados los MEF y alcanzada la confluencia, se trataron con VH o TX para provocar la delección de ILK (ver Materiales y Métodos) consiguiendo una reducción de aproximadamente el 70% en los niveles proteicos de ILK en los MEF Cre-lox, demostrada por western blot y por inmunofluorescencia (Figura 40 A y B).

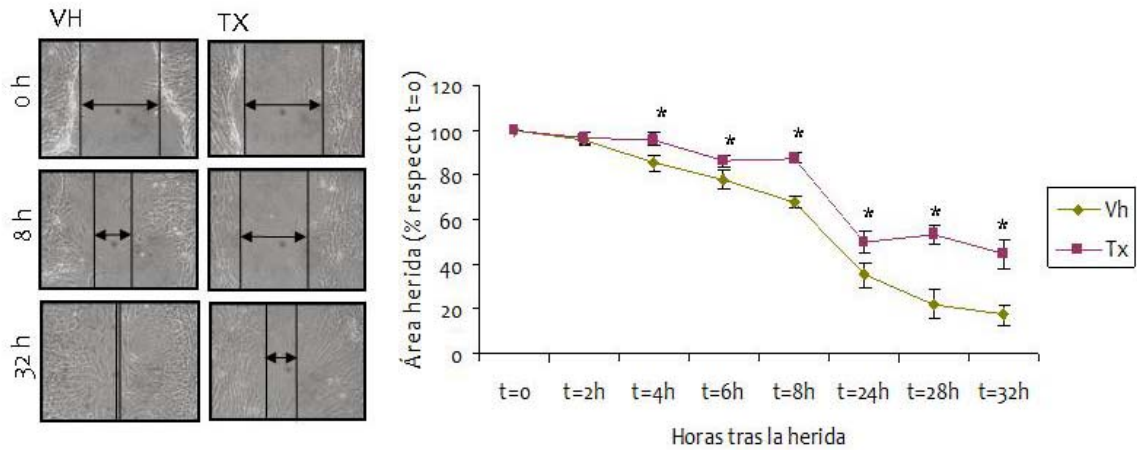
Una vez conseguida la delección de ILK, la monocapa celular se dañó artificialmente con una aguja recreando de esta forma el modelo de herida *in vitro*. El cierre de la herida *in vitro* se monitorizó durante las 32 horas siguientes cuantificando la distancia entre los bordes de la herida a distintos tiempos. Se observó que, del mismo modo que ocurría en animales, la delección de ILK estaba provocando el enlentecimiento en el cierre de la herida *in vitro* (Figura 41A). Se comprobó que el TX no tenía ninguna participación en este proceso al realizar el experimento en MEF obtenidos de los animales Cre (Figura 41B) y Lox (Figura 41C).



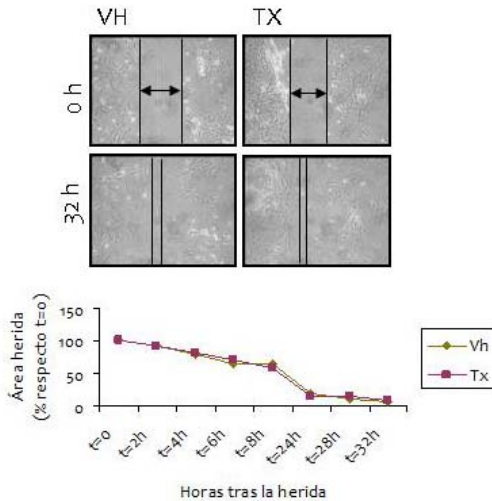
**Figura 40. Delección condicional de ILK en MEF.** (A) Expresión de ILK por western blot en proteínas extraídas de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) Cre-lox, Cre y Lox tratados con vehículo (VH) o tamoxifeno (TX). Los valores que aparecen bajo las bandas son media  $\pm$  error estándar de la media de los valores densitométricos corregidos para el control de carga (GAPDH) de 8 experimentos diferentes. \* $p < 0.05$  vs VH. (B) Expresión de ILK por inmunofluorescencia en MEF Cre-lox tratados con VH o TX.



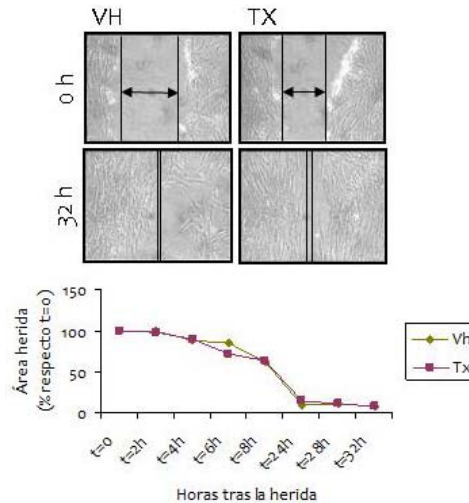
A



B



C



**Figura 41. Cinética del cierre de la herida *in vitro*.** (A) Cinética cierre herida en MEF Cre-lox tratados con vehículo (VH) o tamoxifeno (TX). La gráfica representa la media  $\pm$  error estándar de la media del porcentaje del cierre monitorizado durante 32 horas de 6 experimentos diferentes. \* $p < 0.05$  vs VH. (B y C) Cinética cierre herida en MEF Cre (B) y Lox (C) tratados con VH o TX. La gráfica representa la media  $\pm$  error estándar de la media del porcentaje del cierre monitorizado durante 32 horas de 6 experimentos diferentes. Las microfotografías muestran un experimento típico.

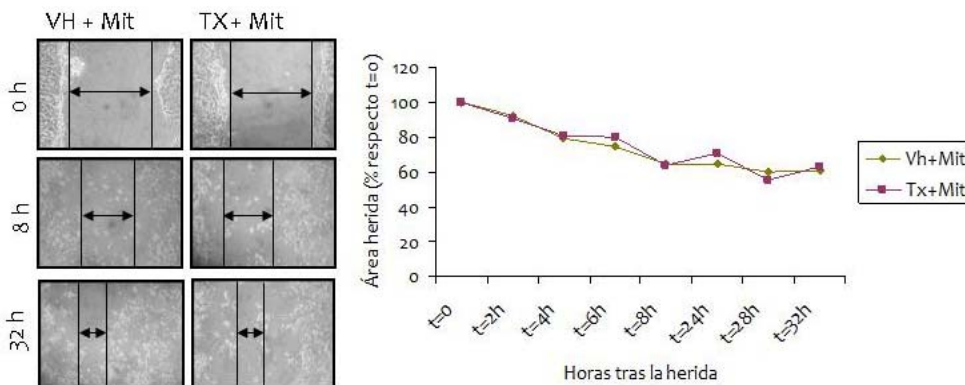
Los experimentos de herida *in vitro* se repitieron en presencia de Mitomicina C (Mit), un inhibidor de la proliferación. Se

pudo comprobar que, en presencia del inhibidor, las diferencias en la cinética de cierre desaparecían (Figura 42A) lo que

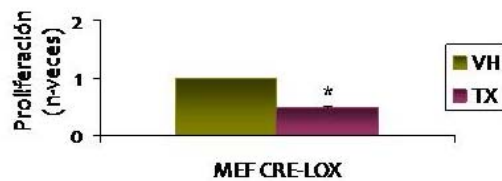
sugería que el causante del retardo en el cierre podía ser una reducida proliferación de los MEF deficientes en ILK. Se realizó entonces un ensayo de proliferación (WST-1) con estas células, incubándolas con un 10 % de suero de ternera fetal, y se observó que la tasa de proliferación de los MEF tratados con TX estaba reducida en un 50 % respecto a los tratados con VH (Figura 42B). Este dato se confirmó también en tejido

cutáneo, realizando una tinción con un anticuerpo anti-ki-67, proteína nuclear que se expresa en células en proliferación. La tinción fue significativamente menor en los tejidos procedentes de animales deficientes en ILK encontrando la mayor diferencia al día 5 tras la realización de la herida (Figura 42C).

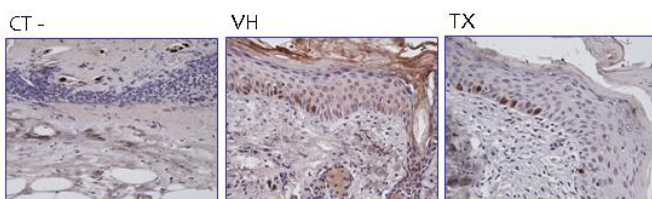
A



B



C

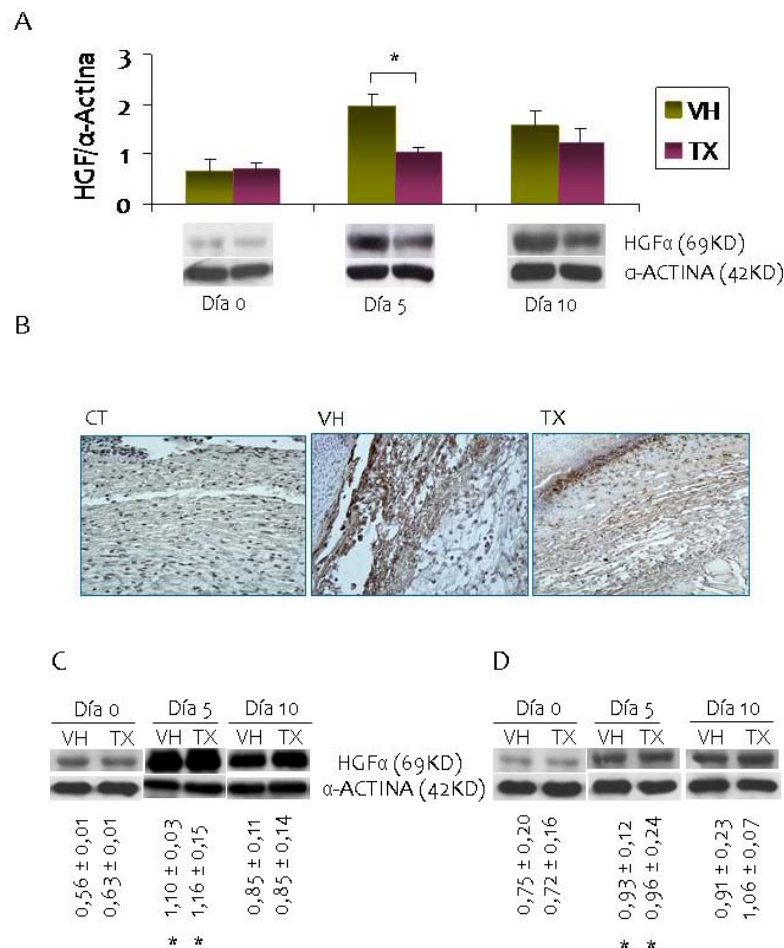


**Figura 42. Ensayo de proliferación.** (A) Cinética cierre herida en MEF Cre-lox tratados con vehículo (VH) o tamoxifeno (TX) en presencia de Mitomicina C (Mit, 10 µg/mL). La gráfica representa la media ± error estándar de la media del porcentaje del cierre monitorizado durante 32 horas de 6 experimentos diferentes. Las microfotografías muestran un experimento típico. (B) Ensayo proliferación WST-1. MEF procedentes de ratones Cre-lox fueron tratados con VH o TX y cultivados en presencia de 10 % suero de ternera fetal. La gráfica representa la media ± error estándar de la media del incremento de proliferación considerando VH como unidad de 3 experimentos diferentes. \*p<0.05 vs VH. (C) Expresión de Ki-67 por inmunohistoquímica en piel de ratones Cre-lox 5 días después de la herida. CT representa el control negativo de la técnica.

### 3.4. Expresión de HGF en heridas y MEF

Buscando un mecanismo por el cual los animales deficientes en ILK mostraban un cierre de herida retardado, se analizó el contenido en HGF en cortes de heridas y extractos proteicos extraídos de heridas a diferentes días. En los animales con la ILK intacta (Cre-lox tratados con VH) se encontró un aumento en los niveles de HGF

desde el día 5, manteniéndose hasta el 10 después de la herida. Sin embargo, en los animales deficientes en ILK (TX), la herida no promovió el incremento esperado de HGF (Figura 43A). Estos datos fueron confirmados por inmunohistoquímica de tejidos a los 5 días de herida (Figura 43B). En los animales Cre y Lox la herida promovió el mismo incremento de los niveles de HGF en los tratados con VH o TX (Figura 43 C y D).

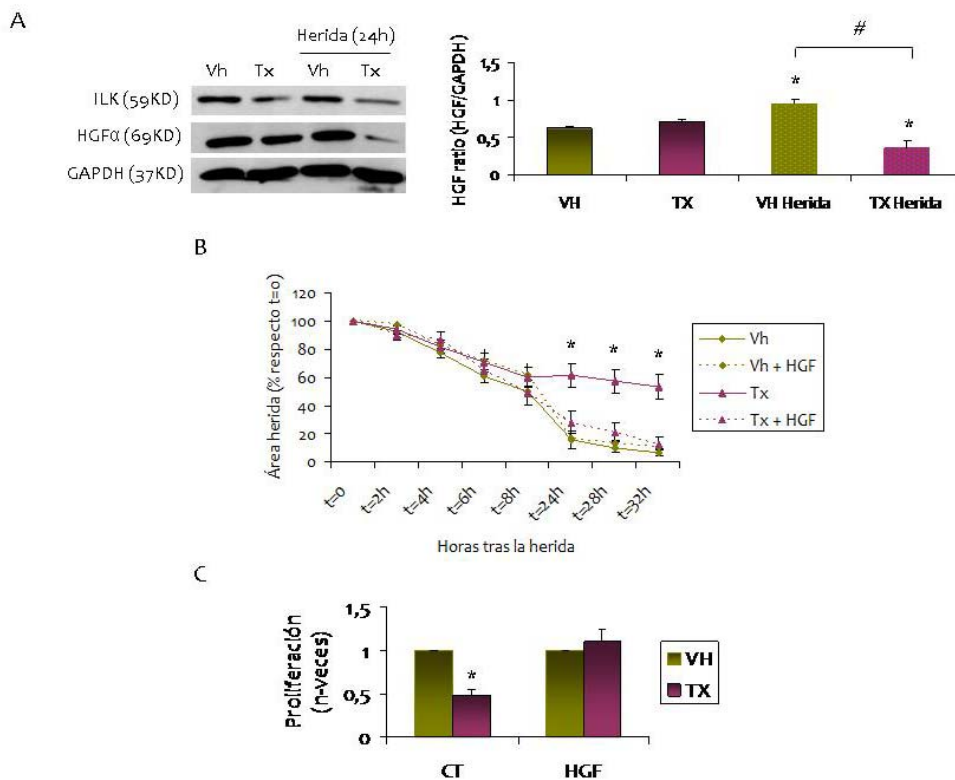


**Figura 43. Expresión de HGF in vivo.** (A) Expresión de HGF en piel analizada por western blot a 5 y 10 días después de la herida en animales Cre-lox tratados con vehículo (VH) o tamoxifeno (TX). La gráfica representa la media ± error estándar de la media de los valores densitométricos de corregidos para el control de carga (α-Actina) de 6 animales por grupo. \*p<0.05 TX vs VH. (B) Expresión de HGF por inmunohistoquímica en piel de ratones Cre-lox tratados con VH o TX tomada cinco días después de la herida. CT representa el control negativo de la técnica. (C y D) Western blot de HGF en piel de ratones Cre (C) y Lox (D) tratados con VH o TX a los 5 y 10 días después de la herida. Los valores bajo las bandas son la media ± error estándar de la media de los análisis densitométricos corregidos para el control de carga (α-Actina) de 6 animales por grupo. p<0.05 vs día 0 en su mismo grupo.

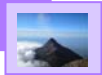
La expresión de HGF tras la inducción de la herida fue cuantificada también en el modelo de herida *in vitro*. Se observó que 24 horas tras la herida se producía un aumento de HGF en los MEF tratados con VH, mientras que en el caso de los MEF tratados con TX este aumento no se alcanzaba, produciéndose incluso una disminución (Figura 44A).

3.5. El retardo en el cierre de la herida es debido al descenso en la expresión de HGF

Para comprobar si el defecto en la producción de HGF inducido por la deficiencia en ILK está implicado en el enlentecimiento del cierre de la herida, se repitieron los experimentos de herida *in vitro* en presencia de HGF humano durante la herida, observándose que la adición de HGF revertía las diferencias entre los MEF



**Figura 44. Expresión de HGF en el modelo de herida *in vitro*.** (A) Expresión de ILK y HGF por western blot en MEF, tratados con vehículo (VH) o tamoxifeno (TX), antes y 24 horas después de producir una herida *in vitro*. La gráfica representa la media ± error estándar de la media de los valores densitométricos corregidos para el control de carga (GAPDH) de 3 experimentos diferentes. \* $p < 0.05$  vs sin herida. # $p < 0.05$  TX vs VH con herida. (B) Cinética cierre de herida en MEF Cre-lox tratados con VH o TX en presencia o ausencia de 40 ng/mL de HGF. La gráfica representa la media ± error estándar de la media del porcentaje de cierre monitorizado durante 32 horas de 3 experimentos diferentes. \* $p < 0.05$  vs los demás grupos experimentales. (C) Ensayo proliferación WST-1. MEF de los ratones Cre-lox se trataron con VH o TX y se incubaron en presencia o ausencia (CT) de HGF (40 ng/mL) durante 24 horas. La gráfica muestra la media ± error estándar de la media del incremento de proliferación considerando VH como unidad en cada condición experimental de 3 experimentos diferentes. \* $p < 0.05$  vs VH.



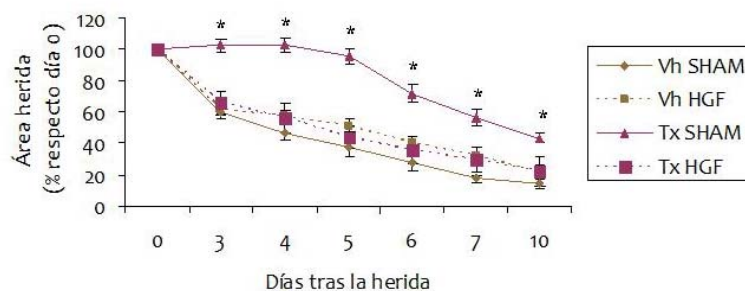
tratados con VH o TX (Figura 44B). Además la proliferación de los MEF deficientes en ILK tratados con HGF fue comparable a aquellos con la ILK intacta (Figura 44C).

Con el propósito de confirmar si el defecto en la expresión de HGF es la causa del retardo en el cierre de la herida también *in vivo*, se realizó una transfección del plásmido de HGF humano en los ratones VH y TX mediante electroporación (ver Materiales y métodos) y teniendo en cuenta la cinética de incorporación (Cruzado et al., 2004), se realizaron las heridas dos días después de la transfección. De esta manera se alcanzarían los niveles máximos de HGF circulante durante los primeros días de herida y se mantendrían durante el estudio del cierre. En primer lugar se confirmó que la transfección había resultado exitosa cuantificando en plasma los niveles de HGF humano mediante un ELISA (VH:  $190 \pm 103.3$  pg/mL y TX:  $113.5 \pm 54.1$  pg/mL). Los resultados mostraron que en los animales deficientes en ILK transfectados con HGF

humano el cierre de las heridas fue similar a los animales con ILK intacta (Figura 45).

### 3.6. Análisis de los mecanismos moleculares implicados

Con el objeto de profundizar en los mecanismos moleculares implicados en la regulación del proceso de reparación de las heridas por ILK se utilizaron los MEF aislados de los ratones Cre-lox y se sometieron al modelo de herida *in vitro*. En primer lugar se observó cómo la herida produjo un incremento en la actividad de ILK, mostrada como un aumento en la fosforilación de GSK  $3\beta$  en la serina 9 y de Akt en la serina 473 (Figura 46A). La actividad de ILK fue inhibida al incubar las células con LY294002 (LY) por lo que parece ser que la inducción de ILK tras la herida es dependiente de PI3Kinasas. LY también inhibió el aumento en la expresión

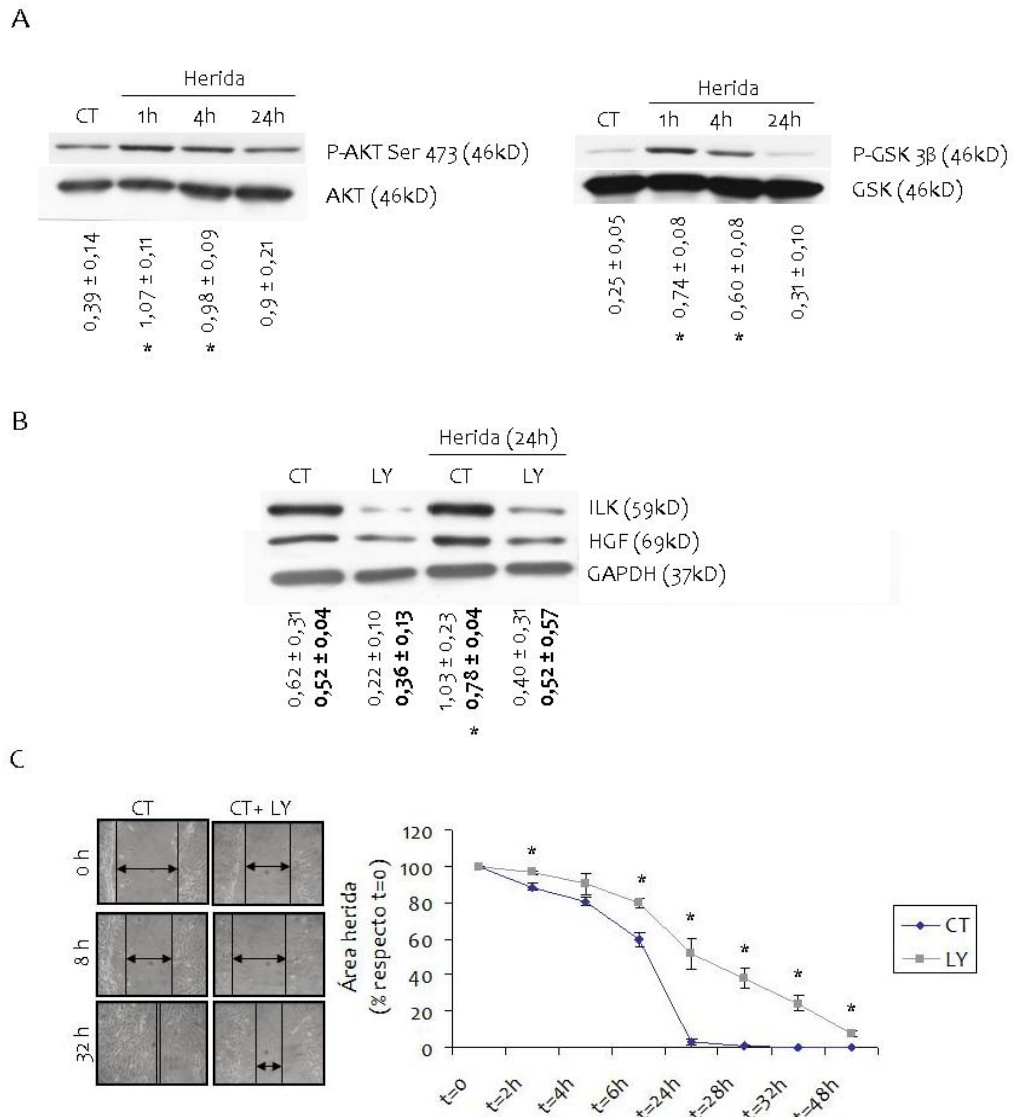


**Figura 45. Cinética del cierre de la herida en animales transfectados con HGF humano.** Los ratones Cre-lox tratados con vehículo (VH) o tamoxifeno (TX) se transfectaron con un plásmido conteniendo HGF humano o un plásmido vacío (SHAM) dos días antes de hacer las heridas. La gráfica muestra la media  $\pm$  error estándar de la media del porcentaje de cierre monitorizado durante 10 días de 6 animales por grupo. Se muestran los ratones Cre-lox VH y TX con HGF y los SHAM (animales transfectados con plásmido vacío). \* $p < 0.05$  vs el resto de grupos experimentales.



de HGF (Figura 46B) indicando que la inducción de HGF en la herida es dependiente de la activación de ILK mediada por PI3K. Se realizó además un estudio de la cinética del cierre de la herida en presencia del inhibidor y se observó que al inhibir la PI3K las células se

comportan como si estuvieran tratadas con TX, presentando una cinética de cierre retardada (Figura 46C); sugiriendo que el mecanismo molecular por el que está implicada ILK y consecuentemente HGF en la herida es PI3K dependiente.



**Figura 46. Mecanismos moleculares implicados en la herida.** (A) Medida activación ILK por western blot de P-AKT y P-GSK 3β en MEF tras la realización de la herida *in vitro*. Los valores debajo de las bandas son la media ± error estándar de la media del análisis densitométrico corregido por AKT y GSK total respectivamente de 3 experimentos diferentes. \* $p < 0.05$  vs MEF sin herida (CT). (B) Expresión de ILK y HGF por western blot tras la herida en presencia del inhibidor de la PI3K, LY294002 (LY 30μM). Los valores bajo las bandas son la media ± error estándar de la media de los análisis densitométricos de 3 experimentos diferentes. En negrita para el HGF. (C) Cinética cierre herida en presencia de LY294002. La gráfica muestra la media ± error estándar de la media de los porcentajes de cierre de 3 experimentos diferentes. \* $p < 0.05$  vs MEF sin herida (CT).

---

## **Discusión**

El desarrollo de los organismos multicelulares requiere de las interacciones entre las células y su entorno extracelular. La unión de integrinas a la MEC cataliza el ensamblaje de complejos multiproteicos que transducen señales mecánicas y químicas, regulando muchos aspectos de la fisiología celular (Hynes 2002, Legate et al., 2009). La respuesta de los tejidos, bien sea durante el desarrollo normal o cómo consecuencia del mecanismo de reparación tras un daño, depende de manera crucial de la comunicación entre el interior y el exterior celular incluyendo la comunicación con las células adyacentes y entre las células y la matriz extracelular que generan. Para realizar un correcto acoplamiento entre estas señales existen además de los propios receptores de membrana, como las integrinas, una serie de proteínas intracelulares, algunas con actividad quinasa, entre las que se encuentra ILK.

Desde su descubrimiento hace más de una década, ILK ha sido ampliamente estudiada y caracterizada como una proteína integrada dentro de un complejo multifuncional que regula, de manera dinámica, las señales derivadas de las

interacciones integrina-matriz o de las estimulaciones provocadas por factores de crecimiento. Los mecanismos por los que regula estos procesos están siendo debatidos en la actualidad, planteándose si la función mediada por ILK procede de su actividad quinasa o de la asociación con PINCH y parvina y la formación de un complejo ternario estable en los sitios de adhesión célula-matriz. Las evidencias experimentales sugieren que ambos aspectos de ILK están implicados y que, en cualquier caso, ILK constituye un importante mediador de la señalización de integrinas (Legate et al., 2006; Troussard et al., 2003; Attwell et al., 2000; Persad et al., 2000; Wu et al., 2004).

La evaluación de la función de ILK a partir de diferentes estudios con deleciones tejido específicas ha demostrado las importantes contribuciones de ILK a muchos procesos celulares, incluyendo supervivencia, proliferación, diferenciación, adhesión, migración y contractilidad. Su deleción interrumpe, por tanto, una parte importante de la cascada de señalización iniciada por los componentes de la MEC y mediada por integrinas. El papel específico de ILK en mantener la función y estructura normal de un tejido en particular depende por completo del contexto biológico en el que se encuentra. Es por ello que existen



datos discordantes en la literatura acerca del papel de ILK. Por ejemplo, en células musculares lisas se ha descrito que la disminución del contenido celular de ILK o de su actividad produce un aumento de la proliferación y migración de las células, tras una lesión (Ho et al., 2008), o sin ella (Gkretsi et al., 2008), mientras que otros estudios demuestran que el déficit de ILK disminuye la proliferación celular (Dwivedi et al., 2008). En la adhesión celular también se ha descrito un efecto dual. En condrocitos, un menor contenido de ILK conduce a una adhesión deficiente (Grashoff et al., 2003), mientras que en células endoteliales su delección aumenta la adhesión a las proteínas de matriz (Vouret-Craviari et al., 2004). En general, las evidencias más sólidas demuestran que cuando se deleciona ILK ocurren defectos significativos en el desarrollo normal y la homeostasis de los tejidos, mientras que su expresión aumenta en determinadas patologías.

La manipulación genética que conduce al silenciamiento o eliminación selectiva de un determinado gen ha resultado ser una de las estrategias más útiles para comprender en profundidad las funciones biológicas de un determinado gen. En el caso de ILK, el *knock-out* del gen es incompatible con el desarrollo normal de

los embriones y, si bien ha aportado una información importante sobre el papel de esta proteína en la organogénesis (Sakai et al., 2003), no permite obtener información válida sobre su importancia en individuos adultos. Por este motivo, se planteó realizar la delección condicional del gen según la estrategia Cre-lox.

En nuestro modelo se plantearon varios retos. El primero fue estudiar en qué concentración y por qué vía de administración el tamoxifeno sería efectivo para producir la activación de Cre. Aún sabiendo que la expresión de unas pocas moléculas de Cre en la célula podrían ser suficientes para escindir las secuencias Lox y el ADN que albergan (Zuo, 2002), nos preocupó en gran medida el grado de delección del gen y la máxima disminución de la proteína para poder realizar un estudio de relevancia. La administración oral de tamoxifeno produjo resultados muy variables, por lo que se decidió administrarlo por vía intraperitoneal. Con la primera dosis de tamoxifeno, 1 mg/día durante cinco días consecutivos, no se alcanzaron unos niveles de delección relevantes, mientras que con un aumento del 50 % de la dosis, 1.5 mg/día, fue suficiente para alcanzar los niveles tisulares necesarios para la completa delección del gen. El mantenimiento de esta delección del

gen resultó además fundamental para dar tiempo a la degradación de la proteína existente. Con tres semanas de espera desde el tratamiento de los animales hasta su utilización, se trataba de asegurar la completa eliminación del tamoxifeno del organismo, evitando su interferencia en los experimentos realizados, y proporcionando un tiempo suficiente para una degradación significativa de la proteína. Es importante resaltar que, si bien no se realizaron experimentos específicos para la detección de tamoxifeno a nivel tisular, algo teóricamente posible, siempre se introdujeron controles que recibieron el fármaco, para controlar sus posibles interferencias.

El estudio específico de la delección en diferentes órganos fue obligado, pues el modelo no implica una delección tejido específica, sino que sucede a nivel sistémico y tiene que ver, en parte, con la penetración del tamoxifeno en cada tejido y en cada animal. Esto llevó por tanto, aunque la dosis y el tiempo de administración del tamoxifeno quedaran definidos en la primera parte del análisis experimental, a comprobar siempre la delección en el animal con el que se iba a trabajar, y valorar así si era apto para el estudio.

Los presentes resultados demuestran que es posible establecer un modelo viable de animales adultos sin ILK. El siguiente paso, pues, era estudiar los cambios fenotípicos que pudieran tener lugar en estos animales tras la disminución significativa de la proteína. En este sentido, nuestro grupo de investigación ha empezado a desarrollar distintos estudios. Los primeros, y a los que se hace referencia en esta tesis, se encuentran relacionados con la función vascular y con el remodelado tisular.

Estudios previos han revelado la importancia de ILK en la función cardiovascular. Se ha descrito cómo puede regular la producción de NO en macrófagos a través de la regulación de la óxido nítrico sintasa inducible (Tan et al., 2002), cómo su supresión en el endotelio conduce a defectos de vascularización y letalidad embrionaria (Friedrich et al., 2004; Guo et al., 2009), o cómo en corazón esta delección conduce a una insuficiencia cardíaca (White et al., 2006). Un trabajo previo del grupo demostró, en un modelo *in vitro* donde células mesangiales eran cultivadas sobre COL I para simular una MEC alterada, que la activación de integrinas y de ILK, indujo un descenso en la sGC y en el cGMP producido (De Frutos et al., 2005). Nuestros datos en animales corroboraron completamente



este hallazgo, ya que la delección condicional de ILK condujo a un aumento de la sGC y de la PKG en la aorta. En relación a estímulos que conduzcan a un aumento de la sGC, nuestro grupo ha publicado recientemente otros dos artículos, siempre en el contexto de las interacciones célula-matriz. Se ha descrito, *in vitro*, cómo el RGDS (tetrapéptido Arginina-Glicina-Asparagina-Serina) incrementa el contenido de sGC en células contráctiles y cómo, a consecuencia de ello, las células musculares lisas responden mejor a los donadores de NO (Díez-Marqués et al., 2006). Por otro lado, *in vivo*, se ha demostrado cómo la administración a ratas de tirofiban, conduce a un aumento en la sGC, demostrando que determinadas estrategias desarrolladas para modificar el contenido vascular de la sGC pueden ser muy relevantes desde el punto de vista terapéutico (Ruiz-Torres et al., 2009).

En nuestro caso, la delección de ILK en aorta indujo un aumento tanto en la subunidad  $\beta_1$  de la sGC (sGC  $\beta_1$ ) como en la PKG. El cGMP sintetizado por la sGC actúa directamente sobre la PKG, y su expresión y actividad están reguladas por múltiples factores. Aunque no hay mucha información sobre los estímulos capaces de incrementar su expresión, sí que se ha encontrado reducida en vasos aislados y

expuestos a agentes generadores de radicales libres (Szocs et al., 2007), hipoxia (Hassoun et al., 2004), toma elevada de sales (Kagota et al., 2002), y algunas citoquinas (Takata et al., 2001).

La sGC está formada por dos subunidades,  $\alpha$  y  $\beta$ , siendo la  $\beta_1$  la principal isoforma a nivel vascular. Aunque existen descripciones previas que demuestran que la regulación de la subunidad  $\alpha$  condiciona modificaciones significativas de la actividad enzimática, estudios previos de nuestro grupo, incluyendo la demostración de que el RGDS y el tirofiban incrementaban sGC  $\beta_1$ , han puesto de manifiesto la relevancia de la subunidad  $\beta_1$  en la regulación de la actividad del enzima (Lucas et al., 2000). Como la función biológica principal de la sGC es actuar como receptor intracelular del NO, produciendo como segundo mensajero el GMP cíclico que activa directamente la PKG, decidimos evaluar las consecuencias funcionales del incremento de estas proteínas dependiente de ILK, estudiando la respuesta vascular a la administración de donadores de NO y análogos del cGMP. En primer lugar, se examinaron las diferencias en la presión sanguínea en respuesta a los agonistas de la sGC y la PKG, SNP y 8-Br respectivamente, en los ratones Cre-lox con y sin ILK. La delección de ILK provocó que, incluso con

dosis muy bajas de los agonistas a las que los controles no respondieron, los ratones deficientes en ILK sufrieron una respuesta hipotensiva. Además, en anillos de aorta extraídos de animales deficientes en ILK también se detectó una mayor síntesis de cGMP en respuesta a SNP, y una mayor fosforilación de VASP, sustrato de la PKG (Hofmann et al., 2006), en respuesta al tratamiento con SNP o 8-Br. Estos resultados ponen de manifiesto la relevancia funcional de los cambios observados en sGC  $\beta_1$  y PKG en las aortas procedentes de los ratones deficientes en ILK. Además, el hecho de que los efectos observados fueran totalmente bloqueados por ODQ, un inhibidor específico de sGC, y DT3, un antagonista de la PKG, sostiene con mayor firmeza que los cambios en sGC- $\beta_1$  y PKG inducidos por la falta de ILK son críticos en el incremento de la respuesta vascular observada.

A partir de estos resultados, se consideró la importancia y utilidad de inhibir ILK para el tratamiento de aquellas situaciones patológicas que cursan con un contenido vascular disminuido de la sGC. Los nitratos orgánicos ejercen su efecto vasodilatador actuando como donadores de NO dentro de los vasos sanguíneos. Sin embargo, con una administración repetida, la acción hemodinámica del nitrato se

pierde y aparece una tolerancia que limita la utilidad de los nitratos como terapia única. Uno de los mecanismos mejor conocidos de este mecanismo adaptativo es que el NO disminuye la estabilidad del ARN mensajero de la sGC (Filippov et al., 1997), si bien más recientemente se ha descrito que el NO provoca la nitrosilación de una serina específica que disminuye la actividad enzimática (Sayed et al., 2007). El tratamiento crónico con IDN (Cheng 2006; Ruiz-Torres et al., 2009) produjo un descenso en el contenido en sGC en la aorta de los animales que, habiendo sido previamente tratados con el vehículo, conservaban intacta la ILK. Por el contrario, los ratones deficientes en ILK no presentaron esta disminución, consiguiendo de esta manera hacerse resistentes a la desensibilización y desarrollando una respuesta hipotensiva tras la administración de nitritos.

Del mismo modo, se ha observado una disminución en la actividad de la sGC en patologías como la hipertensión (Dumitrascu et al., 2006) y el envejecimiento (Kloss et al., 2000). La falta de ILK podría incrementar la actividad de la sGC  $\beta_1$  en algunas de estas situaciones, aumentando así la respuesta hipotensiva a los donadores de NO. Para analizar esta cuestión se realizaron los experimentos en



un modelo de hipertensión aguda inducida con AII (Yang et al., 2003). Ambos grupos experimentales respondieron al donador de NO, pero fueron los animales con déficit en ILK los que revertieron la hipertensión de manera significativa.

Estos resultados sugieren que ILK podría constituir una nueva diana terapéutica en el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares, basándose en la regulación que esta quinasa tiene sobre la expresión y la actividad de la sGC y la PKG. En relación a esto, recientemente se ha descrito que BAY 41-2272, un estimulador de la sGC, conduce a un aumento de los niveles de cGMP y puede ser efectivo en reducir la fibrosis durante la hipertensión (Masuyama et al., 2009). La combinación del agonista con la sobre-expresión proteica podría constituir una asociación muy potente para tratar las enfermedades cardiovasculares.

Después de analizar las consecuencias funcionales de la deleción de ILK a nivel vascular, en condiciones basales, se planteó la posibilidad de que esta proteína fuera también importante en los procesos de remodelado tisular. Estos estudios eran, esencialmente, distintos de los hasta aquí planteados, dado que el remodelado tiene lugar, por definición, tras

la generación de daño tisular. Por ejemplo, Shafiei y colaboradores (Shafiei et al., 2006) han analizado el papel de ILK en el remodelado hepático. Nosotros, por nuestra parte, planteamos la realización de un modelo de herida cutánea, por su accesibilidad y facilidad de seguimiento. Existen estudios previos que demuestran la relevancia de la actividad de ILK en la fisiología normal de la piel, regulando la proliferación de queratinocitos (Yang et al., 2008), formando parte de los contactos focales en fibroblastos y siendo importante para su proliferación (Sakai et al., 2003), o en el desarrollo del folículo piloso (Lorenz et al., 2007; Nakrieko et al., 2008). Pero no se habían analizado antes las consecuencias que una deleción de ILK generaría en la reparación de una herida en la piel del animal adulto.

En nuestro modelo animal, se observó una deleción casi completa de ILK en piel, que condujo a un retraso en el cierre de la herida desde el primer día hasta diez días después del seguimiento de la misma. Esta deceleración en el cierre es debida estrictamente a la falta de ILK, descartando cualquier influencia del tamoxifeno, ya que en el cierre de las heridas de los ratones controles Cre y Lox, tratados con vehículo o tamoxifeno, no se observaron diferencias. Para realizar un



análisis en profundidad de los mecanismos implicados en esta deceleración, se trasladó el estudio a un cultivo de fibroblastos embrionarios (MEF) de estos ratones. El tratamiento de los MEF con tamoxifeno produjo una delección del 70 % de la proteína. Se realizó un modelo de herida *in vitro* en estos cultivos celulares, y se observó también un retraso en el cierre debido a la disminución de ILK, ya que el cierre fue comparable en los cultivos controles realizados a partir de los ratones Cre y Lox, independientemente de que fueran tratados o no con tamoxifeno.

Este resultado permitió utilizar los MEF como herramienta para el análisis de los mecanismos implicados. Se analizó el cierre de la herida en presencia de un inhibidor de la proliferación, la Mitomicina C, y ya no se observaron diferencias ante la presencia y ausencia de ILK en el proceso del cierre, descartando la migración como responsable del retraso. Se confirmó entonces que los MEF sin ILK mostraban una disminución en su tasa de proliferación del 50 % y, trasladando este resultado al animal, se observó que en el día 5, como día más representativo, se observaba también una marcada disminución en la proliferación en el folículo piloso de la herida y en la epidermis, que es donde comienza la formación del nuevo tejido.

Una importante cuestión es si proteínas involucradas en la reparación de la herida lo hacen a través de ILK. En la búsqueda de posibles dianas alteradas por la delección de ILK, se detectó una disminución en los niveles de HGF en las heridas de los animales deficientes en ILK. HGF es una proteína clave en la regulación de la reparación de las heridas, y su importancia en la herida cutánea quedó demostrada al utilizar un modelo animal en el que se suprimió su expresión (Yoshida et al., 2003). Además, su expresión en las heridas cutáneas aumenta (Cowin et al., 2001), hecho que se objetiva también en las heridas realizadas en nuestros animales tratados con vehículo. Sin embargo, la delección de ILK impidió el aumento en la expresión de HGF que tiene lugar normalmente tras la generación de una herida. Esto sugirió que ya no es sólo la disminución, sino la falta de aumento, lo que conduce al retraso en la re-epitelización de nuestros animales. Se comprobó que ocurría lo mismo en los niveles de la proteína *in vitro* y se pensó entonces que si la falta de ILK estaba interfiriendo en la síntesis de HGF y esto, como última consecuencia, provocaba el enlentecimiento del cierre de la herida, el siguiente paso sería añadir de manera exógena HGF. Se observó que la adición exógena de HGF al cultivo revertía las



diferencias observadas tanto en el cierre de la herida como en la proliferación. También la suplementación de HGF *in vivo* revirtió el retraso en el cierre de la herida provocado por el déficit en ILK. La estrategia de administración de HGF humano ha sido publicada (Cruzado et al., 2004) y se basa en la incorporación de un plásmido que expresa HGF al músculo, por electroporación.

Recientemente se ha publicado que la delección de ILK en hígado conduce a cambios en esta citoquina, que son responsables de una respuesta defectuosa de la regeneración tisular tras una hepatectomía (Apte et al., 2009). Los resultados sobre la disminución en los niveles de HGF tras la delección de ILK en hígado son comparables a los nuestros en piel. Otros estudios confirman los resultados obtenidos en nuestro trabajo. En concreto Kapoor y colaboradores demostraron que la delección de GSK  $\beta$  en fibroblastos aumenta la velocidad de cierre de la herida cutánea (Kapoor et al., 2008). Como se ha explicado en la Introducción, GSK  $\beta$  es una de las dianas de ILK que la fosforila, inactivándola. Por tanto, si se deleciona ILK se induce la activación de GSK  $\beta$ , con la consecuente deceleración en el cierre de la herida.

Los mecanismos moleculares por los que HGF aumenta durante la herida y el crítico papel de ILK en su activación, están empezando a ser explorados. Se ha comprobado que tras la herida *in vitro* se produce un aumento en la fosforilación de GSK  $\beta$  en la serina 9 y en la fosforilación de Akt en la serina 473, sugiriendo un aumento en la actividad de ILK. La quinasa responsable fosforilación de Akt en la serina 473 continúa siendo controvertida, habiéndose propuesto muchos candidatos incluyendo la autofosforilación (Toker and Newton, 2000), ILK (Persad et al., 2001) o mTOR (Sarbasov et al., 2005). Además, muy recientemente se ha descrito que ILK interacciona con *ricor*, componente de mTOR, y que ambos son requeridos para la fosforilación de Akt en la serina 473 (McDonald et al., 2008). Aunque la activación de Akt en esta serina depende del contexto biológico en el que se encuentra la célula, PI3K es el enzima clave en la generación del segundo mensajero, fosfatidilinositol trifosfato, que conduce a la translocación de Akt desde el citoplasma a la membrana plasmática. Para determinar si la activación de ILK durante la herida cutánea era PI3K dependiente, se bloqueó la vía PI3K con un inhibidor, LY294002 (Fayard et al., 2005), observándose una disminución de ILK y de HGF. Cuando se analizó el cierre de la herida en presencia de

LY, se observó además una reproducción exacta de lo que sucedía en presencia del tamoxifeno. Por tanto, la inhibición de esta vía reproduce los efectos de la delección de ILK y el bloqueo de HGF, con la consecuente deceleración en el cierre de la herida.

Estos resultados son la primera descripción de un retraso en la reparación de la herida cutánea en ratones adultos deficientes en ILK. Un defecto en el incremento de HGF en respuesta al daño podría ser responsable de los cambios en el cierre que caracterizan a los animales deficientes en esta proteína. Nuestro estudio pone, por tanto, de manifiesto las consecuencias clínicas que supondría el bloqueo de ILK en piel para la regulación de las heridas cutáneas. Por extensión, se podría postular un importante papel en los procesos de remodelado de otros tejidos, incluyendo los vasos.

---

## **Sumario de Resultados**

1.- La mejor pauta de administración de tamoxifeno en los ratones Cre-lox, con la que se consiguió una máxima deleción de ILK en distintos tejidos especialmente la pared vascular, consiste en la inyección intraperitoneal durante cinco días consecutivos de 1.5 mg/día/ratón de 4-OH-tamoxifeno.

2.- Es necesario que transcurran tres semanas desde la última inyección de tamoxifeno para obtener una marcada disminución del contenido proteico.

3.- La deleción condicional de ILK en la pared vascular determina el incremento de dos proteínas relacionadas con la respuesta vascular al óxido nítrico, la sGC y la PKG.

4.- En los animales con deleción de ILK, el aumento de estas proteínas repercute en un incremento en la respuesta vasodilatadora a agonistas del óxido nítrico, como el SNP, y a análogos del cGMP, como el 8-Br.

5.- La deleción de ILK incrementa además esta respuesta vasodilatadora durante procesos patológicos que cursan con una función vascular alterada, como la taquifilaxia o la hipertensión.

6.- La deleción condicional de ILK en la piel induce un retardo en la cicatrización de la herida, *in vivo* e *in vitro*, debida en parte a un defecto en la proliferación celular.

7.- Esta cicatrización defectuosa parece ser debida, al menos en parte, a un déficit en la síntesis de HGF, y la administración de esta citoquina, tanto *in vitro* como *in vivo*, revierte el defecto en la cicatrización.

8.- El mecanismo molecular que implica a la actividad de ILK y al incremento en la síntesis de HGF como necesarios para un correcto cierre de la herida, parece ser dependiente de PI3K.

---

## Conclusiones



- 1.- Es posible realizar la delección de ILK en ratones adultos a través del sistema Cre-lox, permitiendo establecer una herramienta de trabajo para el estudio de la implicación de esta proteína en distintos tejidos.
- 2.- La delección de ILK a nivel vascular condiciona un incremento en los sistemas enzimáticos intracelulares implicados en la relajación celular, por lo que el bloqueo de las proteínas podría ser postulado como una herramienta útil para inducir vasodilatación tanto en condiciones normales como en procesos patológicos.
- 3.- En un proceso de reparación de tejidos, como es la herida cutánea, la activación de ILK a través de la PI3K resulta fundamental para el incremento en la expresión de HGF y la correcta cicatrización de la herida.

---

## **Bibliografia**



## A

Aicher A, Zeiher AM, Dimmeler S (2005). Mobilizing endothelial progenitor cells. *Hypertension* 45, 321–325.

Akhtar N, Marlow R, Lambert E, Schatzmann F, Lowe ET, Cheung J, Katz E, Li W, Wu C, Dedhar S, Naylor MJ, Streuli CH (2009). Molecular dissection of integrin signalling proteins in the control of mammary epithelial development and differentiation. *Development* 136, 1019–27.

Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 357, 593–615.

Amendt C, Mann A, Schirmacher P and Blessing M (2002). Resistance of keratinocytes to TGFbeta-mediated growth restriction and apoptosis induction accelerates re-epithelialization in skin wounds. *J Cell Sci* 115, 2189–2198.

Anthis NJ, Wegener KL, Ye F, Kim C, Goult BT, Lowe ED, Vakonakis I, Bate N, Critchley DR, Ginsberg MH and Campbell LD (2009). The structure of an integrin/talin complex reveals the basis of inside-out signal transduction. *EMBO J*

Aoyagi Y, Fujita N, Tsuru T (2005). Stabilization of integrin-linked kinase by binding to Hsp90. *Biochem Biophys Res Commun* 331, 1061–1068.

Apte U, Gkretsi V, Bowen WC, Mars WM, Luo JH, Donthamsetty S, Orr A, Monga SP, Wu C, Michalopoulos GK (2009). Enhanced liver regeneration following changes induced by hepatocyte-specific genetic ablation of integrin-linked kinase. *Hepatology* 50, 844–51.

Araki K, Imaizumi T, Okuyama K, Oike Y, Yamamura K (1997). Efficiency of recombination by Cre transient expression in embryonic stem cells: comparison of various promoters. *J Biochem* 122, 977–82.

Asahara T, Murohara T, Sullivan A et al. (1997). Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275, 964–7.

Attwell S, Roskelley C and Dedhar S (2000). The integrin-linked kinase (ILK) suppresses anoikis. *Oncogene* 19, 3811–3815.

## B

Ballestrem C, Hinz B, Imhof BA and Wehrle-Haller B (2001). Marching at the front and dragging behind: differential  $\alpha\beta$ 3-integrin turnover regulates focal adhesion behavior. *J Cell Biol* 155, 1319–1332.

Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M (2008). Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Rep Reg* 16, 585–601.

Bauersachs J, Thum T (2007). Endothelial progenitor cell dysfunction. Mechanisms and therapeutic approaches. *Eur J Clin Invest* 37, 603–606.

Belvindrah R, Nalbant P, Ding S, Wu C, Bokoch GM and Muller U (2006). Integrin-linked kinase regulates Bergmann glial differentiation during cerebellar development. *Mol Cell Neurosci* 33, 109–125.



Bendig G, Grimmmer M, Huttner IG, Wessels G, Dahme T, Just S, Trano N, Katus HA, Fishman MC, Rottbauer W (2006). Integrin-linked kinase, a novel component of the cardiac mechanical stretch sensor, controls contractility in the zebrafish heart. *Genes Dev* 20, 2361-72.

Benoit DS, Tripodi MC, Blanchette JO, Langer SJ, Leinwand LA, Anseth KS (2007). Integrin-linked kinase production prevents anoikis in human mesenchymal stem cells. *J Biomed Mater Res A* 81, 259-68.

Berrier AL and Yamada KM (2007). Cell-Matrix Adhesion. *J Cell Physiol* 213, 565-573.

Brakebusch C and Fässler R (2003). The integrin-actin connection, an eternal love affair. *The EMBO Journal* 22, 2324-2333.

Brew K, Dinakarandian D, Nagase H (2000). Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* 1477, 267-83.

Bottaro DP, Rubin JS, Faletto DL, Chan AM, Kmiecik TE, Vande Woude GF, Aaronson SA (1991). Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science* 251, 802-4.

Böttcher RT, Lange A, Fässler R (2009). How ILK and kindlins cooperate to orchestrate integrin signalling. *Curr Opin Cell Biol*.

Boudreau N, Sympson CJ, Werb Z, Bissell MJ (1995). Suppression of ICE and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix. *Science* 267, 891-893.

Boudreau N, Jones PL (1999). Extracellular matrix and integrin signalling: the shape of things to come. *Biochem J* 339, 481-8.

Boulter E, Van Obberghen-Schilling E (2006). Integrin-linked kinase and its partners: A modular platform regulating cell-matrix adhesion dynamics and cytoskeletal organization. *Europ J Cell Biol* 85, 255-263.

Brown C, Pan X, Hassid A (1999). Nitric oxide and C-type atrial natriuretic peptide stimulate primary aortic smooth muscle cell migration via a cGMP-dependent mechanism: relationship to microfilament dissociation and altered cell morphology. *Circ Res* 84, 655-667.

## C

---

Chavakis E and Dimmeler S (2002). Regulation of endothelial cell survival and apoptosis during angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22, 887-893.

Cheng JW (2006). A review of isosorbide dinitrate and hydralazine in the management of heart failure in black patients, with a focus on a new fixed-dose combination. *Clin Ther* 28, 666-678.

Cho HJ, Youn SW, Cheon SI, Kim TY, Hur J, Zhang SY, Lee SP, Park KW, Lee MM, Choi YS, Park YB, Kim HS (2005). Regulation of endothelial cell and endothelial progenitor cell survival and vasculogenesis by integrin-linked kinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25, 1154-1160.

Choi J, Park SY, Joo CK (2004). Hepatocyte growth factor induces proliferation of lens epithelial cells through activation of ERK1/2 and JNK/SAPK. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45, 2696-704.

Chu H, Thievensen I, Sixt M, Lammermann T, Waisman A, Braun A, Noegel AA and Fassler R (2006). gamma-Parvin is dispensable for hematopoiesis, leukocyte trafficking, and T-cell-dependent antibody response. *Mol Cell Biol* 26, 1817-1825.

Clouthier DE, Comerford SA, Hammer RE (1997). Hepatic fibrosis, glomerulosclerosis, and a lipodystrophy-like syndrome in PEPCK-TGF-beta1 transgenic mice. *J Clin Invest* 100, 2697-713.

Cohen MP, Ziyadeh FN, Chen S. (2006). Amadori-modified glycated serum proteins and accelerated atherosclerosis in diabetes: pathogenic and therapeutic implications. *J Lab Clin Med* 147, 211–9.

Cowin AJ, Kallincos N, Hatzirodos N, Gray Robertson J, Pickering KJ, Couper J, Belford DA (2001). Hepatocyte growth factor and macrophage-stimulating protein are upregulated during excisional wound repair in rats. *Cell Tissue Res* 306, 239–250.

Cruzado JM, Lloberas N, Torras J, Riera M, Fillat C, Herrero-Fresneda I, Aran JM, Alperovich G, Vidal A, Grinyó JM (2004). Regression of Advanced Diabetic Nephropathy by Hepatocyte Growth Factor Gene Therapy in Rats. *Diabetes* 53, 1119–1126.

## D

---

Dajnowiec D, Langille BL (2007). Arterial adaptations to chronic changes in haemodynamic function: coupling vasomotor tone to structural remodelling. *Clin Sci* 113, 15–23.

Davis KL, Martin E, Turco IV and Murad F (2001). Novel effects of nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41, 203–236.

Dai C, Stolz DB, Bastacky SI, St-Arnaud R, Wu C, Dedhar S and Liu Y (2006). Essential role of integrin-linked kinase in podocyte biology: Bridging the integrin and slit diaphragm signaling. *J Am Soc Nephrol* 17, 2164–2175.

Dallas SL, Sivakumar P, Jones CJ, Chen Q, Peters DM, Mosher DF, Humphries MJ, Kielty CM (2005). Fibronectin regulates latent transforming growth factor-beta (TGF beta) by controlling matrix assembly of latent TGF beta-binding protein-1. *J Biol Chem* 280, 18871–80.

Danen EH and Yamada KM (2001). Fibronectin, integrins, and growth control. *J Cell Physiol* 189, 1–13.

Danielian PS, White R, Hoare SA, Fawell SE, and Parker, MG (1993). Identification of residues in the estrogen receptor that confer differential sensitivity to estrogen and hydroxytamoxifen. *Mol. Endocrinol* 7, 232–240.

De Frutos S, Saura M, Griera M, Rivero-Vilches FJ, Zaragoza C, Rodriguez-Puyol D, and Rodriguez-Puyol M (2005). Differential Regulation of Soluble Guanylyl Cyclase Expression and Signaling by Collagens: Involvement of Integrin-Linked Kinase. *J Am Soc Nephrol* 16, 2626–2635.

Dedhar S and Hannigan GE (1996). Integrin cytoplasmic interactions and bidirectional transmembrane signalling. *Current Opinion in Cell Biology* 8, 657–669.

Dedhar S (2000). Cell-substrate interactions and signaling through integrin linked kinase (ILK). *Curr Opin Cell Biol* 12, 250–256.

Delcommenne M, Tan C, Gray V, Rue L, Woodgett J, Dedhar S (1998). Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 11211–11216.

Deng JT, Lierop JEV, Sutherland C and Walsh MP (2001). Calcium-independent smooth muscle contraction: a novel role for integrin linked kinase. *J Biol Chem* 276, 16365–16373.

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

Diehl JA, Cheng M, Roussel MF, Sherr CJ (1998). Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev* 12, 3499–3511.



Díez-Marqués ML, Ruiz-Torres MP, Griera M, López-Ongil S, Saura M, Rodríguez-Puyol D, Rodríguez-Puyol M (2006). Arg-Gly-Asp (RGD)-containing peptides increase soluble guanylate cyclase in contractile cells. *Cardiovasc Res* 69, 359-369.

Ding L, Dong L, Chen X, Zhang L, Xu X, Ferro A, Xu B (2009). Increased expression of integrin-linked kinase attenuates left ventricular remodeling and improves cardiac function after myocardial infarction. *Circulation* 120, 764-73.

Dumitrascu R, Weissmann N, Ghofrani HA, Dony E, Beuerlein K, Schmidt H et al. (2006). Activation of soluble guanylate cyclase reverses experimental pulmonary hypertension and vascular remodeling. *Circulation* 113, 286-295.

Dwivedi A, Sala-Newby GB, George SJ (2008). Regulation of cell-matrix contacts and beta-catenin signaling in VSMC by integrin-linked kinase: implications for intimal thickening. *Basic Res Cardiol* 103, 244-56.

## E

---

El-Aouni C, Herbach N, Blattner SM, Henger A, Rastaldi MP, Jarad G, Miner JH, Moeller MJ, St-Arnaud R, Dedhar S et al. (2006). Podocyte-specific deletion of integrin-linked kinase results in severe glomerular basement membrane alterations and progressive glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol* 17, 1334-1344.

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

## F

---

Fawell SE, Lees JA, White R and Parker MG (1990). Characterization and colocalization of steroid binding and dimerization activities in the mouse estrogen receptor. *Cell* 60, 953-962.

Fayard E, Tintignac LA, Baudry A, Hemmings BA (2005). Protein kinase B/Akt at a glance. *J Cell Science* 118, 5675-5678.

Feil R, Brocard J, Mascrez B, LeMeur M, Metzger D, Chambon P (1996). Ligand-activated site specific recombination in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 10887-10890.

Feil R, Lohmann SM, De Jonge H, Walter U, Hofmann F (2003). Cyclic GMP-dependent protein kinases and the cardiovascular system: insights from genetically modified mice. *Cir Res* 93, 907-916.

Feil S, Valtcheva N, Feil R (2009). Inducible Cre mice. *Methods Mol Biol*, 530, 343-63.

Feng XH, Derynck R (2005). Specificity and versatility in TGF- $\beta$  signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21, 659-693.

Filipenko NR, Attwell S, Roskelley C, Dedhar S, (2005). Integrin-linked kinase activity regulates Rac- and Cdc42-mediated actin cytoskeleton reorganization via alpha-PIX. *Oncogene* 24, 5837-5849.

Filippov G, Bloch DB, Bloch KD (1997). Nitric oxide decreases stability of mRNAs encoding soluble guanylate cyclase subunits in rat pulmonary artery smooth muscle cells. *J Clin Invest* 100, 942-948.

Friedrich EB, Liu E, Sinha S, Cook S, Milstone DS, MacRae CA, Mariotti M, Kuhlencordt PJ, Force T, Rosenzweig A, St-Arnaud R, Dedhar S and Gerszten RE (2004). Integrin-Linked Kinase Regulates Endothelial Cell Survival and Vascular Development. *Molec Cellular Biol* 24, 8134-8144.

Fukao M, Mason HS, Britton FC, Kenyon JL, Horowitz B, Keef KD (1999). Cyclic GMP-dependent protein kinase activates cloned BKCa channels expressed in mammalian cells by direct phosphorylation at serine 1072. *J Biol Chem* 274, 10927–10935.

Fukuda T, Guo L, Shi X, Wu C (2003a). CH-ILKBP regulates cell survival by facilitating the membrane translocation of protein kinase B/Akt. *J Cell Biol* 160, 1001-1008.

Fukuda T, Chen K, Shi X, Wu C (2003b). PINCH-1 is an obligate partner of integrin-linked kinase (ILK) functioning in cell shape modulation, motility, and survival. *J Biol Chem* 278, 51324–51333.

Furchgott RF (1990). The 1989 Ulf von Euler lecture. Studies on endothelium-dependent vasodilation and the endothelium-derived relaxing factor. *Acta. Physiol. Scand.* 139, 257–270.

## G

Gailit J, Welch MP and Clark RA (1994). TGF-beta 1 stimulates expression of keratinocyte integrins during re-epithelialization of cutaneous wounds. *J Invest Dermatol* 103, 221-227.

Galis ZS, Khatri JJ (2002). Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res* 90, 251-62.

García G, Rodríguez-Puyol M, Alajarín R, Serrano I, Sánchez-Alonso P, Griera M, Vaquero JJ, Rodríguez-Puyol D, Alvarez-Builla J and Diez-Marques ML (2009). Losartan-Antioxidant Hybrids: Novel Molecules for the Prevention of Hypertension-Induced Cardiovascular Damage. *J Med Chem* 52, 7220-7227.

Gary DS, Milhavet O, Camandola S and Mattson MP (2003). Essential role for integrin linked kinase in Akt-mediated integrin survival signaling in hippocampal neurons. *J Neurochem* 84, 878-890.

Gauldie J, Bonniaud P, Sime P, Ask K, Kolb M (2007). TGF-beta, Smad3 and the process of progressive fibrosis. *Biochem Soc Trans* 35, 661-4.

Gheyara AL, Vallejo-Illarramendi A, Zang K, Mei L, St-Arnaud R, Dedhar S and Reichardt LF (2007). Deletion of integrin-linked kinase from skeletal muscles of mice resembles muscular dystrophy due to alpha 7 beta 1-integrin deficiency. *Am J Pathol* 171, 1966-1977.

Gibbons GH, Dzau VJ. (1994). The emerging concept of vascular remodeling *N Engl J Med* 330, 1431-1438.

Gimbrone MA, Jr. (1999). Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherosclerosis. *Thromb Haemostasis* 82, 722–726.

Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA. (2006). Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation* 114, 597–605.

González-Santiago L, López-Ongil S, Rodríguez-Puyol M, Rodríguez-Puyol D (2002). Decreased nitric oxide synthesis in human endothelial cells cultured on type I collagen. *Circ Res* 90, 539-45.

Gorman C and Bullock C (2000). Site-specific gene targeting for gene expression in eukaryotes. *Curr Opin Biotechnol* 11, 455–460.

Graff JR, Deddens JA, Konicek BW, Colligan BM, Hurst BM, Carter HW, Carter JH (2001). Integrin linked kinase expression increases with prostate tumor grade. *Clin Cancer Res* 7, 1987-91.

Grashoff C, Aszodi A, Sakai T, Hunziker EB, Fässler R (2003). Integrin linked kinase regulates chondrocyte shape and proliferation. *EMBO Rep* 4 432–438.



Greenhalgh DG, Sprugel KH, Murray MJ and Ross R (1990). PDGF and FGF Stimulate Wound Healing in the Genetically Diabetic Mouse. *Am J Pathology* 136, 1235-1246.

Gkretsi V, Bowen WC, Yang Y, Wu C and Michalopoulos GK (2007a). Integrin linked kinase is involved in matrix-induced hepatocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 353, 638-643.

Gkretsi V, Mars WM, Bowen WC, Barua L, Yang Y, Guo L, St-Arnaud R, Dedhar S, Wu C and Michalopoulos GK (2007b). Loss of integrin linked kinase from mouse hepatocytes in vitro and in vivo results in apoptosis and hepatitis. *Hepatology* 45, 1025-1034.

Grose R, Hutter C, Bloch W, Thorey I, Watt FM, Fässler R, Brakebusch C and Werner S (2002). A crucial role of  $\beta 1$  integrins for keratinocyte migration in vitro and during cutaneous wound repair. *Development* 129, 2303-2315.

Grose R and Werner S (2004). Wound-healing studies in transgenic and knockout mice. *Mol Biotechnol* 28, 147-166.

Guadagno TM, Ohtsubo M, Roberts JM, Assoian RK (1993). A link between cyclin A expression and adhesion-dependent cell cycle progression. *Science* 262, 1572-1575.

Guo W, Jiang H, Gray V, Dedhar S and Rao Y (2007). Role of the integrin-linked kinase (ILK) in determining neuronal polarity. *Dev Biol* 306, 457-468.

Guo L, Wenzhen Yu, Xiaoxin Li, Gang Zhao, Peiyong He (2009). Targeting of Integrin-Linked Kinase with a Small Interfering RNA Inhibits Endothelial Cell Migration, Proliferation and Tube Formation in vitro. *Ophthalmic Res* 42, 213-220.

## H

---

Hamilton DL, Abremski K (1984). Site-specific recombination by the bacteriophage P1 lox-Cre system. Cre-mediated synapsis of two lox sites. *J Mol Biol* 178, 481-486.

Hanafy KA, Krumenacker JS, Murad F (2001). NO, nitrotyrosine and cGMP in signal transduction. *Med Sci Monit* 7, 801-819.

Hanahan D and Folkman J (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86, 353-364.

Hannigan GE, Leung-Hagesteijn C, Fitz-Gibbon L, Coppolino MG, Radeva G, Filmus J, Bell JC, Dedhar S (1996). Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin linked protein kinase. *Nature* 379, 91-96.

Hannigan GE, Troussard AA, Dedhar S (2005). Integrin-linked kinase: a cancer therapeutic target unique among its ILK. *Nat Rev Cancer* 5, 51-63.

Hannigan GE, Coles JG, Dedhar S (2007). Integrin-Linked Kinase at the Heart of Cardiac Contractility, Repair, and Disease. *Circ Res* 100, 1408-1414.

Hassoun PM, Filippov G, Fogel M, Donaldson C, Kayyali US, Shimoda LA et al. (2004). Hypoxia decreases expression of soluble guanylate cyclase in cultured rat pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 30, 908-913.

Heino J, Huhtala M, Käpylä J, Johnson MS (2009). Evolution of collagen-based adhesion systems. *Int J Biochem Cell Biol* 41, 341-8.

Ho B, Guangpei Hou, J Geoffrey Pickering, Gregory Hannigan, B Lowell Langille and Michelle P Bendeck (2008). Integrin-Linked Kinase in the Vascular Smooth Muscle Cell Response to Injury. *The American Journal of Pathology*, 173, No. 1.

Hofmann F, Feil R, Kleppisch T, Schlossmann J (2006). Function of cGMP-dependent protein kinases as revealed by gene deletion. *Physiol Rev* 86, 1-23.

Honda S, Shirotani-Ikejima H, Tadokoro S, Maeda Y, Kinoshita T, Tomiyama Y, Miyata T (2009). Integrin-linked kinase associated with integrin activation. *Blood* 113, 5304-13.

Hosokawa R, Urata MM, Ito Y, Bringas P Jr, Chai Y (2005). Functional significance of Smad2 in regulating basal keratinocyte migration during wound healing. *J Invest Dermatol* 125, 1302-9.

Hristov M, Zerneck A, Liehn EA, Weber C (2007). Regulation of endothelial progenitor cell homing after arterial injury. *Thromb. Haemost.* 98, 274-277.

Huang Y, J Li, Y. Zhang and C Wu (2000). The roles of integrin-linked kinase in the regulation of myogenic differentiation. *J Cell Biol* 150, 861-871.

Huang J, Mahavadi S, Sriwai W, Hu W and Murthy KS (2006). Gi-coupled receptors mediate phosphorylation of CPI-17 and MLC20 via preferential activation of the PI3K/ILK pathway. *Biochem J* 396, 193-200.

Hynes RO (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69, 11-25.

Hynes RO (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110, 673-687.

## I

---

Iglesias-De la Cruz MC, Ruiz-Torres P, Alcamí J, Díez-Marqués L, Ortega-Velázquez R, Chen S, Rodríguez-Puyol M, Ziyadeh FN and Rodríguez-Puyol D (2001). Hydrogen peroxide increases extracellular matrix mRNA through TGF- $\beta$  in human mesangial cells. *kidney international* 59, 87-95.

Ignarro LJ (1990). Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 30, 535-560.

Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 84,9265-9269.

Indra AK, Warot X, Brocard J, Bornert JM, Xiao JH, Chambom P and Metzger D (1999). Temporally-controlled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis: comparison of the recombinase activity of the tamoxifen-inducible Cre-ERT and Cre-ERT2 recombinases. *Nucleic Acids Research* 27, 4324-4327.

## J

---

Joshi MB, Ivanov D, Philippova M, Erne P and Resink TJ (2007). Integrin linked kinase is an essential mediator for T-cadherin-dependent signaling via Akt and GSK3 $\beta$  in endothelial cells. *FASEB J* 21, 3083-3095.

## K

---

Kagota S, Tamashiro A, Yamaguchi Y, Nakamura K, Kunitomo M (2002). High salt intake impairs vascular nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate system in spontaneously hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther* 302, 344-351.



Kanasaki K, Kanda Y, Palmsten K, Tanjore H, Lee SB, Lebleu VS, Gattone VH, Jr and Kalluri R (2008). Integrin beta1-mediated matrix assembly and signalling are critical for the normal development and function of the kidney glomerulus. *Dev Biol* 313, 584-593.

Kapoor M, Liu S, Shi-wen X, Huh K, McCann M, Denton CP, Woodgett JR, Abraham DJ, Leask A. (2008). GSK-3beta in mouse fibroblasts controls wound healing and fibrosis through an endothelin-1-dependent mechanism. *J Clin Invest* 118(10), 3279-90.

Kloss S, Bouloumie A, Mulsch A (2000). Aging and chronic hypertension decrease expression of rat aortic soluble guanylyl cyclase. *Hypertension* 35, 43-47.

Knoll R, Postel R, Wang J, Kratzner R, Hennecke G, Vacaru AM, Vakeel P, Schubert C, Murthy K, Rana BK et al. (2007). Laminin-alpha4 and integrinlinked kinase mutations cause human cardiomyopathy via simultaneous defects in cardiomyocytes and endothelial cells. *Circulation* 116, 515-525.

Koesling D, Harteneck C, Humbert P, Bosserhoff A, Frank R, Schultz G, Böhme E (1990). The primary structure of the larger subunit of soluble guanylyl cyclase from bovine lung. Homology between the two subunits of the enzyme. *FEBS Lett* 266, 128-132.

Krumenacker JS, Hanafy KA, Murad F (2004). Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase. *Brain Res Bull* 62, 505-515.

Kuhn R, Torres RM (2002). Cre/loxP Recombination System and Gene Targeting. *Methods Mol Biol* 180, 175-204.

## L

---

Lange A, Wickström SA, Jakobson M, Zent R, Sainio K and Fässler R (2009). Integrin-linked kinase is an adaptor with essential functions during mouse development. *Nature* 461, 1002-1006.

Larjava H, Plow EF, Wu C (2008). Kindlins: essential regulators of integrin signalling and cell-matrix adhesion. *EMBO Rep* 9, 1203-8.

Laukaitis CM, Webb DJ, Donais K and Horwitz AF (2001). Differential dynamics of  $\alpha 5$  integrin, paxillin and  $\alpha$ -actinin during formation and disassembly of adhesions in migrating cells. *J Cell Biol* 153, 1427-1440.

Lee SP, Youn SW, Cho HJ, Li L, Kim TY, Yook HS, Chung JW, Hur J, Yoon CH, Park KW, Oh BH, Park YB, Kim HS (2006). Integrin-linked kinase, a hypoxiaresponsive molecule, controls postnatal vasculogenesis by recruitment of endothelial progenitor cells to ischemic tissue. *Circulation* 114, 150-159.

Legate KR, Montañez E, Kudlacek O, Fässler R (2006). ILK, PINCH and parvin: the tIPP of integrin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 20-31.

Leung-Hagesteijn C, Mahendra A, Naruszewicz I and Hannigan GE (2001). Modulation of integrin signal transduction by ILKAP, a protein phosphatase 2C associating with the integrin-linked kinase, ILK1. *EMBO J* 20, 2160-2170.

Li Y, Tan X, Dai C, Stolz DB, Wang D, Liu Y (2009). Inhibition of integrin-linked kinase attenuates renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 20, 1907-18.

Littlewood TD, Hancock DC, Danielian PS, Parker MG, and Evan GI (1995). A modified oestrogen receptor ligand-binding domain as an improved switch for the regulation of heterologous proteins. *Nucleic Acids Res* 23, 1686-1690.

Liu S, Calderwood DA, Ginsberg MH (2000). Integrin cytoplasmic domain-binding proteins. *J Cell Sci* 113, 3563-71.



Liu E, Sinha S, Williams C, Cyrille M, Heller E, Snapper SB, Georgopoulos K, St-Arnaud R, Force T, Dedhar S et al. (2005). Targeted deletion of integrin-linked kinase reveals a role in T-cell chemotaxis and survival. *Mol Cell Biol* 25, 11145-11155.

Lohmann SM, Vaandrager AB, Smolenski A, Walter U and De Jonge HR (1997). Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trend Biochem Sci* 22, 307-312.

Lorenz K, Grashoff C, Torka R, Sakai T, Langbein L, Bloch W, Aumailley M, Fässler R. (2007). Integrin-linked kinase is required for epidermal and hair follicle morphogenesis. *J Cell Biol* 177, 501-13.

Lucas KA, Pitari GM, Kazerounian S, Ruiz-Stewart L, Park J, Schulz S et al (2000). Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol Rev* 52, 375-413.

## M

---

Ma H, Calderon TM, Kessel T, Ashton AW, Berman JW (2003). Mechanisms of hepatocyte growth factor-mediated vascular smooth muscle cell migration. *Circ Res* 93, 1066-73.

MacKay K, Striker LJ, Stauffer JW, Doi T, Agodoa LY, and Striker GE (1989). Transforming growth factor- $\beta$ . Murine glomerular receptors and responses of isolated glomerular cells. *J Clin Invest* 83, 1160-1167.

Mackinnon AC, Qadota H, Norman KR, Moerman DG and Williams BD (2002). C. elegans PAT-4/ILK functions as an adaptor protein within integrin adhesion complexes. *Curr Biol* 12, 787-797.

Marotta A, Tan C, Gray V, Malik S, Gallinger S, Sanghera J, Dupuis B, Owen D, Dedhar S, Salh B (2001). Dysregulation of integrin-linked kinase (ILK) signaling in colonic polyposis. *Oncogene* 20, 6250-7.

Marti HP, Lee L, Kashgarian M, and Lovett DH. (1994). Transforming growth factor-beta 1 stimulates glomerular mesangial cell synthesis of the 72-kd type IV collagenase. *Am J Pathol* 144, 82-94.

Martínez-Salgado C, Fuentes-Calvo I, García-Cenador B, Santos E, López-Novoa JM (2006). Involvement of H- and N-Ras isoforms in transforming growth factor-beta-1-induced proliferation and in collagen and fibronectin synthesis. *Exp Cell Res* 312, 2093-106.

Massague J (1990). The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol* 6, 597-641.

Massague J and Chen YG (2000). Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev.* 14, 627-644.

Masuyama H, Tsuruda T, Sekita Y, Hatakeyama K, Imamura T, Kato J, Asada Y, Stasch JP and Kitamura K (2009). Pressure-independent effects of pharmacological stimulation of soluble guanylate cyclase on fibrosis in pressure-overloaded rat heart *Hypertension Research* 32, 597-603.

Matsumoto K, Hashimoto K, Yoshikawa K, Nakamura T (1991). Marked stimulation of growth and motility of human keratinocytes by hepatocyte growth factor. *Exp Cell Res* 196, 114-120.

Matsumoto K, Nakamura T (1997). Hepatocyte growth factor (HGF) as a tissue organizer for organogenesis and regeneration. *Biochem Biophys Res Commun* 239, 639-44.

Matsumoto K, Nakamura T (2001). Hepatocyte growth factor: renotropic role and potential therapeutics for renal diseases. *Kidney Int* 59, 2023-38.

Mattioni T, Louvion JF and Picard D (1994). Regulation of protein activities by fusion to steroid binding domains. *Methods Cell Biol* 43, 335-352.



- McDonald PC, Oloumi A, Mills J, Dobрева I, Maidan M, Gray V, Wederell ED, Bally MB, Foster LJ, Dedhar S (2008). Rictor and integrin-linked kinase interact and regulate Akt phosphorylation and cancer cell survival. *Cancer Res* 68, 1618-24.
- Melichar VO, Behr-Roussel D, Zabel U, Uttenthal LO, Rodrigo J, Rupin A, Verbeuren TJ, Kumar HAS, Schmidt HH (2004). Reduced cGMP signaling associated with neointimal proliferation and vascular dysfunction in late-stage atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 16671-6.
- Meng F, Cheng X, Yang L, Hou N, Yang X, Meng A. (2008). Accelerated re-epithelialization in Dpr2-deficient mice is associated with enhanced response to TGFbeta signaling. *J Cell Sci* 121, 2904-12.
- Meredith J, Bazeli B, Schwartz M (1993). The extracellular matrix as a survival factor. *Mol Biol Cell* 4, 953-961.
- Meyer A, van Golen CM, Boyanapalli M, Kim B, Soules ME, Feldman EL (2005). Integrin-linked kinase complexes with caveolin-1 in human neuroblastoma cells. *Biochemistry* 44, 932-938.
- Midwood KS, Williams LV and Schwarzbauer JE (2004). Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36(6), 1031-1037.
- Miller MG, Naruszewicz I, Kumar AS, Ramlal T and Hannigan GE (2003). Integrin-linked kinase is a positive mediator of L6 myoblast differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 310, 796-803.
- Mills J, Digicaylioglu M, Legg AT, Young CE, Young SS, Barr AM, Fletcher L, O'Connor TP and Dedhar S (2003). Role of integrin-linked kinase in nerve growth factor-stimulated neurite outgrowth. *J Neurosci* 23, 1638-1648.
- Mills J, Niewmierzycka A, Oloumi A, Rico B, St-Arnaud R, Mackenzie IR, Mawji NM, Wilson J, Reichardt LF and Dedhar S (2006). Critical role of integrin-linked kinase in granule cell precursor proliferation and cerebellar development. *J Neurosci* 26, 830-840.
- Miyamoto S, Teramoto H, Gutkind JS, Yamada KM (1996). Integrins can collaborate with growth factors for phosphorylation of receptor tyrosine kinases and MAP kinase activation: roles of integrin aggregation and occupancy of receptors. *J Cell Biol* 135, 1633-42.
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. (1989). The biological significance of nitric oxide formation from L-arginine. *Biochem Soc Trans* 17, 642-4.
- Morimoto A, Okamura K, Hamanaka R, Sato Y, Shima N, Higashio K, Kuwano M (1991). Hepatocyte growth factor modulates migration and proliferation of human microvascular endothelial cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 179, 1042-9.
- Morimoto AM, Tomlinson MG, Nakatani K, Bolen JB, Roth RA and Herbst R (2000). The MMAC tumor suppressor phosphatase inhibits phospholipase C and integrin linked kinase activity. *Oncogene* 19, 200-209.
- Mott JD, Werb Z (2004). Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr Opin Cell Biol* 16, 558-64.
- Mulrooney J, Foley K, Vineberg S, Barreuther M and Gabel L (2000). Phosphorylation of the beta1 integrin subunit cytoplasmic domain: toward an understanding of function and mechanism. *Exp Cell Res* 258, 332-341.
- Murad F, Ishi K, Förstermann U, Gorsky L, Kervin JF Jr, Pollock J, Heller M (1990). EDRF is an intracellular second messenger and autacoid to regulate cyclic GMP synthesis in many cells. *Second Messenger Phosphoprotein Res* 24, 441-445.
- Muranyi A, MacDonald JA, Deng JT, Wilson DP, Haystead TA, Walsh MP, Erdodi F, Kiss E, Wu Y and Hartshorne DJ (2002). Phosphorylation of the myosin phosphatase target subunit by integrin-linked kinase. *Biochem J* 366, 211-216.

## N

Nagy A (2000). Cre recombinase: The universal reagent for genome tailoring. *Genesis* 26, 99–109.

Nakhjavani M, Esteghamati A, Khalilzadeh O, Asgarani F, Mansournia N, Abbasi M (2009). Association of macroalbuminuria with oxidized LDL and TGF- $\beta$  in type 2 diabetic patients: a case–control study. *Int Urol Nephrol*.

Nakrieko KA, Welch I, Dupuis H, Bryce D, Pajak A, St Arnaud R, Dedhar S, D'Souza SJ, Dagnino L (2008). Impaired hair follicle morphogenesis and polarized keratinocyte movement upon conditional inactivation of integrin-linked kinase in the epidermis. *Mol Biol Cell* 19, 1462–73.

Naska S, Park K, Hannigan GE, Dedhar S, Miller FD and Kaplan DR (2006). An essential role for the integrin-linked kinase-glycogen synthase kinase-3 $\beta$  pathway during dendrite initiation and growth. *J Neurosci* 26, 13344–13356.

Niewmierzycka A, Mills J, St-Arnaud R, Dedhar S and Reichardt LF (2005). Integrin-linked kinase deletion from mouse cortex results in cortical lamination defects resembling cobblestone lissencephaly. *J Neurosci* 25, 7022–7031.

Nikolopoulos SN, Turner CE (2002). Molecular dissection of actopaxin-integrin-linked kinase-Paxillin interactions and their role in subcellular localization. *J Biol Chem* 277, 15668–75.

Novak A, Hsu SC, Leung-Hagesteijn C, Radeva G, Papkoff J, Montesano R, Roskelley C, Grosschedl R, Dedhar S (1998). Cell adhesion and the integrin-linked kinase regulate the LEF-1 and beta-catenin signalling pathways. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 95, 4374–4379.

## O

Oinuma I, Katoh H and Negishi M (2007). R-Ras controls axon specification upstream of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  through integrin-linked kinase. *J Biol Chem* 282, 303–318.

Oloumi A, McPhee T, Dedhar S (2004). Regulation of E-cadherin expression and beta-catenin/Tcf transcriptional activity by the integrin-linked kinase. *Biochim Biophys Acta.* 1691, 1–15.

Ono T, Tsuji T, Sakai M, Yukizaki C, Ino H, Akagi I, Hiramatsu K, Matsumoto Y, Sugiura Y, Uto H, Tsubouchi H, Gohda E (2009). Induction of hepatocyte growth factor production in human dermal fibroblasts and their proliferation by the extract of bitter melon pulp. *Cytokine* 46(1), 119–26.

Ortega-Velázquez R, Gonzalez-Rubio M, Ruiz-Torres MP, Diez-Marques ML, Iglesias MC, Rodríguez-Puyol M, and Rodríguez-Puyol D (2004). Collagen I upregulates extracellular matrix gene expression and secretion of TGF- $\beta$ 1 by cultured human mesangial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 286, C1335–C1343.

O'Toole TE, Mandelman D, Forsyth J, Shattil SJ, Plow EI, Ginsberg MH (1991). Modulation of the affinity of integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (GP11b-IIIa) by the cytoplasmic domain of  $\alpha_{IIb}$ . *Science* 254, 845–847.

O'Toole TE, Katagiri Y, Faull R J, Peter K, Tamura R, Quaranta V, Loftus JC, Shattil SJ, Ginsberg MH (1994). Integrin cytoplasmic domains mediate inside-out signal transduction. *J Cell Biol* 124, 1047–1059.

## P

Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327, 524–526.



Pasterkamp G, de Kleijn DP, Borst C (2000). Arterial remodeling in atherosclerosis, restenosis and after alteration of blood flow: potential mechanisms and clinical implications. *Cardiovasc Res* 45, 843-52.

Persad S, Attwell S, Gray V, Delcommenne M, Troussard A, Sanghera J, and Dedhar S. (2000). Inhibition of integrin-linked kinase (ILK) suppresses activation of protein kinase B/Akt and induces cell cycle arrest and apoptosis of PTEN-mutant prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 3207–3212.

Persad S, Attwell S, Gray V, Mawji N, Deng JT, Leung D, Yan J, Sanghera J, Walsh MP, Dedhar S (2001). Regulation of protein kinase B/Akt-serine 473 phosphorylation by integrin linked kinase (ILK): critical roles for kinase activity and amino acids arginine-211 and serine-343. *J Biol Chem* 276, 27462-27469.

Picard D (1994). Regulation of protein function through expression of chimaeric proteins. *Curr Opin Biotechnol* 5, 511–515.

Postel R, Vakeel P, Topczewski J, Knoll R and Bakkers J (2008). Zebrafish integrinlinked kinase is required in skeletal muscles for strengthening the integrin-ECM adhesion complex. *Dev Biol* 318, 92-101.

## R

---

Rearden A (1994). A new LIM protein containing an autoepitope homologous to “senescent cell antigen”. *Biochem Biophys Res Commun* 201, 1124-1131.

Reynolds LE, Conti FJ, Silva R, Robinson SD, Iyer V, Rudling R, Cross B, Nye E, Hart IR, Dipersio CM et al. (2008).  $\alpha 3\beta 1$  integrin-controlled Smad7 regulates reepithelialization during wound healing in mice. *J. Clin. Invest.* 118, 965-974.

Riera M, Chillon M, Aran JM, Cruzado JM, Torras J, Grinyó JM, Fillat C (2004). Intramuscular SP1017-formulated DNA electrotransfer enhances transgenes expresión and distribuyes hHGF to different tissues. *J Gene Med* 6, 111-8.

Romer L.H, Birukov KG, Garcia JG (2006). Focal adhesions: paradigm for a signaling nexus. *Circ Res* 98, 606-16.

Rosen EM, Grant DS, Kleinman HK, Goldberg ID, Bhargava MM, Nickoloff BJ, Kinsella JL, Polverini P (1993). Scatter factor (hepatocyte growth factor) is a potent angiogenesis factor in vivo. *Symp Soc Exp Biol* 47, 227-34.

Rossant J, and McMahon A (1999). “Cre”-ating mouse mutants: A meeting review on conditional mouse genetics. *Genes Dev.* 13, 142–145.

Ruetten H, Zabel U, Linz W, Schmidt HH (1999). Downregulation of soluble guanylyl cyclase in young and aging spontaneously hypertensive rats. *Circ Res* 85, 534-41.

Ruiz-Ortega M, Rodríguez-Vita J, Sanchez-Lopez E, Carvajal G, Egido J (2007). TGF-beta signaling in vascular fibrosis. *Cardiovasc Res* 74, 196-206.

Ruiz-Torres MP, Griera M, Chamorro A, Díez-Marqués ML, Rodríguez-Puyol D, Rodríguez-Puyol M (2008). Tirofiban increases soluble guanylate cyclase in rat vascular walls: pharmacological and pathophysiological consequences. *Cardiovascular Res* 82, 125-32.

Russo I, Del Mese P, Doronzo G, Mattiello L, Viretto M, Bosia A, Anfossi G, Trovati M (2008). Resistance to the nitric oxide/cyclic guanosine 5'-monophosphate/protein kinase G pathway in vascular smooth muscle cells from the obese Zucker rat, a classical animal model of insulin resistance: role of oxidative stress. *Endocrinology* 149, 1480-1489.

## S

- Sakai T, Li S, Docheva D, Grashoff C, Sakai K, Kostka G, Braun A, et al. (2003). Integrin-linked kinase (ILK) is required for polarizing the epiblast, cell adhesion, and controlling actin accumulation. *Genes Dev* 17, 926-940.
- Sato C, Tsuboi R, Shi CM, Rubin JS, Ogawa H (1995). Comparative study of hepatocyte growth factor/scatter factor and keratinocyte growth factor effects on human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 104, 958-963.
- Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307, 1098-1101.
- Sarkar R, Meinberg EG, Stanley JC, Gordon D, Webb RC (1996). Nitric oxide reversibly inhibits the migration of cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 78, 225-230.
- Sauer B, Henderson N (1988). Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 5166-70.
- Saura M, Zaragoza C, Herranz B, Griera M, Diez-Marqués ML, Rodríguez-Puyol D, Rodríguez-Puyol M (2005). Nitric Oxide Regulates Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 Signaling in Endothelial Cells. *Circ Res* 97, 1115-1123.
- Sayed N, Baskaran P, Ma X, van den Akker F, Beuve A (2007). Desensitization of soluble guanylyl cyclase, the NO receptor, by S-nitrosylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 12312-12317.
- Schäfer M and Werner S (2007). Transcriptional Control of Wound Repair. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 23, 69-92.
- Schmidt C, Bladt F, Goedecke S, Brinkmann V, Zschieche W, Sharpe M, et al. (1995). Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature* 373, 699-702.
- Schöklmann HO, Lang S, Kralewski M, Hartner A, Ludke A, and Sterzel RB. (2000). Distinct structural forms of type I collagen modulate cell cycle regulatory proteins in mesangial cells. *Kidney Int* 58, 1108-1120.
- Shafiei MS and Rockey DC (2006). The role of integrin-linked kinase in liver wound healing. *J Biol Chem* 281, 24863-72.
- Singer AJ and Clark RA (1999). Cutaneous wound healing. *N. Engl. J. Med.* 341, 738-746.
- Singh R, Alavi N, Singh AK and David J. Leehey (1999). Role of Angiotensin II in Glucose-Induced Inhibition of Mesangial Matrix Degradation. *Diabetes* 48, 2066-2073.
- Siwik DA, Colucci WS (2004). Regulation of matrix metalloproteinases by cytokines and reactive oxygen/nitrogen species in the myocardium. *Heart Fail Rev* 9, 43-51.
- Szocs K, Lassegue B, Wenzel P, Wendt M, Daiber A, Oelze M et al. (2007). Increased superoxide production in nitrate tolerance is associated with NAD(P)H oxidase and aldehyde dehydrogenase 2 downregulation. *J Mol Cell Cardiol* 42, 1111-1118.
- Stanchi F, Grashoff C, Nguemni Yonga CF, Grall D, Fässler R, Van Obberghen-Schilling E (2009). Molecular dissection of the ILK-PINCH-parvin triad reveals a fundamental role for the ILK kinase domain in the late stages of focal adhesion maturation. *J Cell Sci* 122, 1800-11.
- Sternberg N, Hamilton D (1981). Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *J Mol Biol* 150, 467-86.
- Stupack DG and Cheresch DA (2002). Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival. *J. Cell Sci.* 115:3729-3738.



## T

---

- Tan C, Costello P, Sanghera J, Dominguez D, Baulida J, de Herreros AG, Dedhar S (2001). Inhibition of integrin linked kinase (ILK) suppresses beta-catenin-Lef/Tcf-dependent transcription and expression of the Ecadherin repressor, snail, in APC<sup>-/-</sup> human colon carcinoma cells. *Oncogene* 20, 133–140.
- Tan C, Mui A and Dedhar S (2002). Integrin-linked kinase regulates inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression in an NF-kappa B-dependent manner. *J Biol Chem* 277, 3109-3116.
- Tan C, Cruet-Hennequart S, Troussard A, Fazli L, Costello P, Sutton K, Wheeler J, Gleave M, Sanghera J, Dedhar S (2004). Regulation of tumor angiogenesis by integrin-linked kinase (ILK). *Cancer Cell* 5, 79-90.
- Takata M, Filippov G, Liu H, Ichinose F, Janssens S, Bloch DB et al. (2001). Cytokines decrease sGC in pulmonary artery smooth muscle cells via NO-dependent and NO-independent mechanisms. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280, L272–L278.
- Terpstra L, Prud'homme J, Arabian A, Takeda S, Karsenty G, Dedhar S, St-Arnaud R (2003). Reduced chondrocyte proliferation and chondrodysplasia in mice lacking the integrin-linked kinase in chondrocytes. *J Cell Biol* 162, 139-48.
- Tian Y, James S, Zuo J, Fritzsich B, Beisel KW (2006). Conditional and inducible gene recombineering in the mouse inner ear.
- Toker A and Newton AC (2000). Akt/protein kinase B is regulated by autoophosphorylation at the hypothetical PDK-2 site. *J Biol Chem* 275, 8271-8274.
- Touyz RM (2000). Molecular and cellular mechanisms regulating vascular function and structure. Implications in the pathogenesis of hypertension. *Can J Cardiol* 16, 1137-1146.
- Towbin H, Staehlin T, Gordon J (1992). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology* 24, 145-9.
- Toyoda M, Takayama H, Horiguchi N, Otsuka T, Fukusato T, Merlino G, Takagi H, Mori M (2001). Overexpression of hepatocyte growth factor/scatter factor promotes vascularization and granulation tissue formation in vivo. *FEBS Lett* 509, 95-100.
- Troussard AA, Tan C, Yoganathan TN, Dedhar S (1999). Cell-extracellular matrix interactions stimulate the AP-1 transcription factor in an integrin linked kinase-and glycogen synthase kinase 3-dependent manner. *Mol Cell Biol* 19, 7420–7427.
- Troussard AA, Mawji NM, Ong C, Mui A, St -Arnaud R, Dedhar S (2003). Conditional knock-out of integrin-linked kinase demonstrates an essential role in protein kinase B/Akt activation. *J Biol Chem* 278, 22374-8.
- Troussard AA, McDonald PC, Wederell ED, Mawji NM, Filipenko NR, Gelmon KA, Kucab JE, Dunn SE, Emerman JT, Bally MB, Dedhar S (2006). Preferential dependence of breast cancer cells versus normal cells on integrin-linked kinase for protein kinase B/Akt activation and cell survival. *Cancer Res* 66, 393-403.
- Tsutsui M, Shimokawa H, Morishita T, Nakashima Y, Yanagihara N (2006). Development of genetically engineered mice lacking all three nitric oxide synthases. *J Pharmacol Sci* 102, 147-154.
- Tu Y, Li F, Wu C (1998). Nck-2, a novel Src homology2/3-containing adaptor protein that interacts with the LIM-only protein PINCH and components of growth factor receptor kinase-signaling pathways. *Mol Biol Cell* 9, 3367-3382.
- Tu Y, Li F, Goicoechea S, Wu C (1999). The LIM-only protein PINCH directly interacts with integrin-linked kinase and is recruited to integrinrich sites in spreading cells. *Mol Cell Biol* 19, 2425–2434.

Turner CE, Brown MC, Perrotta JA, Riedy MC, Nikolopoulos SN, McDonald AR, et al. (1999). Paxillin LD4 motif binds PAK and PIX through a novel 95-kD ankyrin repeat, ARF-GAP protein: a role in cytoskeletal remodelling. *J Cell Biol* 145, 851-863.

## U

---

Uehara Y, Minowa O, Mori C, Shiota K, Kuno J, Noda T, et al. (1995). Placental defect and embryonic lethality in mice lacking hepatocyte growth factor/scatter factor. *Nature* 373, 702-5.

Urano A, Sugawara A, Kanatsuka H, Arima S, Taniyama Y, Kudo M, Takeuchi K, Ito S (2004). Hepatocyte growth factor stimulates nitric oxide production through endothelial nitric oxide synthase activation by the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway and possibly by mitogen-activated protein kinase kinase in vascular endothelial cells. *Hypertens Res* 27, 887-95.

## V

---

Vane JR, Anggard EE, Botting RM (1990). Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med* 323, 27-36.

Vespa A, D Souza S and Dagnino L (2005). A novel role for integrin-linked kinase in epithelial sheet morphogenesis. *Mol Biol Cell* 16, 4084-4095.

Voziyanov Y, Pathania S, Jayaram M (1999). A general model for sitespecific recombination by the integrase family recombinases. *Nucleic Acids Res* 27, 930-941.

Vouret-Craviari V, Boulter E, Grall D, Matthews C and Van Obberghen-Schilling E (2004). ILK is required for the assembly of matrix-forming adhesions and capillary morphogenesis in endothelial cells. *J Cell Sci* 117, 4559-4569.

## W

---

Wall ME, Francis SH, Corbin JD, Grimes K, Richie-Jannetta R, Kotera J, Macdonald BA, Gibson RR, Trehwella J (2003). Mechanisms associated with cGMP binding and activation of cGMP dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 2380-2385.

Wang HV, Chang LW, Brixius K, Wickstrom SA, Montanez E, Thievensen I, Schwander M, Muller U, Bloch W, Mayer U et al. (2008). Integrin-linked kinase stabilizes myotendinous junctions and protects muscle from stress-induced damage. *J Cell Biol* 180, 1037-1049.

Ward MR, Pasterkamp G, Yeung AC, Borst C (2000). Arterial remodeling. Mechanisms and clinical implications. *Circulation* 102, 1186-91.

Werner S and Grose R (2003). Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol. Rev.* 83, 835-870.

Werner C, Böhm M, Friedrich EB (2008). Role of integrin-linked kinase for functional capacity of endothelial progenitor cells in patients with stable coronary artery disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 377, 331-336.



White DE, Cardiff RD, Dedhar S, Muller WJ (2001). Mammary epithelial specific expression of the integrin-linked kinase (ILK) results in the induction of mammary gland hyperplasias and tumors in transgenic mice. *Oncogene* 20, 7064-7072.

White DE, Coutu P, Shi YF, Tardif JC, Nattel S, St Arnaud R, Dedhar S, Muller WJ (2006). Targeted ablation of ILK from the murine heart results in dilated cardiomyopathy and spontaneous heart failure. *Genes Dev* 20, 2355-60.

Woolf AS, Bosch RJ and Fine LG (1992). Growth factors in the pathogenesis of renovascular complications of diabetes mellitus. *J Hypertens* 10, S11-S16.

Wu C (2001). ILK interactions. *J Cell Sci* 114, 2549-2550.

Wu C (2004). The PINCH-ILK-parvin complexes: assembly, functions and regulation. *Biochim Biophys Acta* 1692, 55-62.

Wu C and Dedhar S (2001). Integrin-linked kinase (ILK) and its interactors: a new paradigm for the coupling of extracellular matrix to actin cytoskeleton and signaling complexes. *The Journal of Cell Biology* 155, 505-510.

## X

---

Xu Z, Fukuda T, Li Y, Zha X, Qin J, Wu C (2005). Molecular dissection of PINCH-1 reveals a mechanism of coupling and uncoupling of cell shape modulation and survival. *J Biol Chem* 280, 27631-27637.

Yang CW, Striker GE, Chen WY, Kopchick JJ, and Striker LJ. (1997). Differential expression of glomerular extracellular matrix and growth factor mRNA in rapid and slowly progressive glomerulosclerosis: studies in mice transgenic for native or mutated growth hormone. *Lab Invest* 76, 467-476.

## Y

---

Yang H, Shi M, VanRemmen H, Chen X, Vijg J, Richardson A, Guo Z (2003). Reduction of pressor response to vasoconstrictor agents by overexpression of catalase in mice. *Am J Hypertens* 16, 1-5.

Yang Y, Tetreault MP, Yermolina YA, Goldstein BG, Katz JP (2008). Krüppel-like factor 5 controls keratinocyte migration via the integrin-linked kinase. *J Biol Chem* 283, 18812-20.

Yasunaga T, Kusakabe M, Yamanaka H, Hanafusa H, Masuyama N, Nishida E. (2005). *Xenopus* ILK (integrin-linked kinase) is required for morphogenetic movements during gastrulation. *Genes Cells* 10, 369-79.

Yoganathan TN, Costello P, Chen X, Jabali M, Yan J, Leung D, Zhang Z, Yee A, Dedhar S and Sanghera J (2000). Integrin-linked kinase (ILK): A "Hot" Therapeutic Target. *Biochemical Pharmacology* 60, 1115-1119.

Yoshida S, Yamaguchi Y, Itami S, Yoshikawa K, Tabata Y, Matsumoto K, et al. (2003). Neutralization of hepatocyte growth factor leads to retarded cutaneous wound healing associated with decreased neovascularization and granulation tissue formation. *J Invest Dermatol* 120, 335-43.

## Z

---

Zabel U, Weeger M, La M, Schmidt HH (1998). Human soluble guanylate cyclase: functional expresión and revised isoenzyme family. *Biochem J* 335, 51-57.

Zamir E, Geiger B (2001). Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci* 114, 3583-90.



Zaragoza C, Balbín M, López-Otín C, Lamas S (2002). Nitric oxide regulates matrix metalloprotease-13 expression and activity in endothelium. *Kidney Int* 61, 804-8.

Zarnegar R, Michalopoulos GK. (1995). The many faces of hepatocyte growth factor: from hepatopoiesis to hematopoiesis. *J Cell Biol* 129, 1177-80.

Zervas CG, Gregory SL and Brown NH (2001). Drosophila integrin-linked kinase is required at sites of integrin adhesion to link the cytoskeleton to the plasma membrane. *J Cell Biol* 152, 1007-1018.

Zhang X, Hu K, Li CY (2001). Protection against oxidized low-density lipoprotein-induced vascular endothelial cell death by integrin-linked kinase, *Circulation* 104, 2762-6.

Zhang Y, Guo L, Chen K, Wu C (2002). A critical role of the PINCH-integrin linked kinase interaction in the regulation of cell shape change and migration. *J Biol Chem* 277, 318-326.

Zhang W, Wu Y, Wu C and Gunst SJ (2007). Integrin-linked kinase regulates NWASp-mediated actin polymerization and tension development in tracheal smooth muscle. *J Biol Chem* 282, 34568-34580.

Zhou FQ, Zhou J, Dedhar S, Wu YH and Snider WD (2004). NGF-induced axon growth is mediated by localized inactivation of GSK-3 $\beta$  and functions of the microtubule plus end binding protein APC. *Neuron* 42, 897-912.

Zuo J (2002). Transgenic and gene targeting studies of hair cell function in mouse inner ear. *J Neurobiol* 53, 286-305.