



UNIVERSITAT DE BARCELONA

Facultat de Biologia

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

**Mecanismo de regulación de NOR-1
en células vasculares:
Implicaciones de las LDL y de la
vía de síntesis de isoprenoides**

Javier Crespo Asensio
Barcelona, Mayo de 2005



UNIVERSITAT DE BARCELONA

Facultat de Biologia

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

Memoria presentada por Javier Crespo Asensio. Programa de doctorado de Biomedicina (bienio 2000-2002), para optar al título de doctor, bajo la dirección de la Dra. Lina Badimon Maestro, Profesora de Investigación del CSIC y el Dr. José Martínez González, Científico titular del CSIC. Este trabajo se ha realizado en el *Laboratori d'Investigació Cardiovascular* (ICCC/CSIC/Hospital de la Santa Creu i Sant Pau).

Barcelona, Mayo de 2005

Los Directores:

Lina Badimon Maestro

José Martínez González

El autor:

Javier Crespo Asensio

*"Investigar es ver lo
que todo el mundo ha
visto, y pensar lo que
nadie más ha
pensado."*

Albert Szent-Györgi
(1893-1986)
Bioquímico

*A Ruth,
A mis padres,
Y a la Cata.*

Este trabajo nunca hubiera sido posible sin la colaboración de muchas personas a las cuáles quiero agradecer ahora toda su ayuda.

En primer lugar quiero dar las gracias a Lina por haberme permitido trabajar en su grupo y permitir que desarrolle mi carrera científica. También quiero agradecerle su apoyo y su ayuda a lo largo de todos estos años tanto en los temas científicos, como en los personales. Gracias.

A Pepe le quiero dar las gracias por ayudarme en la redacción de esta tesis así como su colaboración en los diseños experimentales y en la elaboración de los diferentes artículos que la componen. También agradecerle su implicación en la elección del tribunal.

Además de mis dos directores de tesis, tengo que agradecer a todos mis compañeros de laboratorio la ayuda prestada durante estos años. En especial a Jordi su gran aportación científica a la tesis, y sobretodo darle las gracias por ser mi amigo durante todo este tiempo y que espero podamos seguir siéndolo siempre. "Moltes Gràcies, ha estat tot un plaer". A Berta le quiero agradecer su ayuda en la poyata y su amistad fuera de ella y decir que es una buena amiga y mejor persona. A Silvi darle las gracias por ser la alegría del laboratorio, sin ella, a parte de haber tenido mucho más trabajo, todo hubiera sido más aburrido. A Cristina decirle que nunca me olvidaré del apoyo que me ha dado y que ella es un modelo a seguir como persona y como científica. A Itziar darle las gracias por ser la mejor compañera de poyata que he tenido nunca, fue muy divertido. A Olga decirle que ha sido de gran ayuda en este proyecto y que fuera de él ha sido una gran amiga. A Luis, Javi, Rosario y María, darles las gracias por la ayuda que me han prestado durante este último año de tesis y por los buenos momentos pasados

tanto en la poyata, como en la "Facult". No quiero pasar por alto el agradecer a las personas que pertenecieron a nuestro laboratorio y que me ayudaron en su momento como son Marta G., Clau, Anna, María B., Maya, Judith, Santse e Isabel, a todas ellas muchas gracias.

Quiero dar las gracias también a Silvia Morató, no sólo por su ayuda a nivel de papeleo y de gestiones, sino también por ser una persona que sabe escuchar y con la que se puede hablar.

También agradecer a todos mis antiguos y nuevos compañeros del I.C.C.C. la ayuda prestada cada vez que he necesitado de ella. En especial quiero dar las gracias a Oriol J., sin él los transplantes no hubieran sido lo mismo, a Sonia S., su labor con los cerdos ha sido fundamental para el artículo de las estatinas, a Judith y Albert, por su amistad y estar cuando se les necesita y a Anna Ll, por su ayuda en los transplantes y su alegría a esas horas de la noche y también del día. No quiero olvidarme de Teresa, Vicenta, Pablo F., Gemma, Laura C., Leif, Santi, Carol, Cristina, Jordi, Vanessa, Jureck, Marta M., Sandra, Laura N., Paula, Maisa, Esther, Judith C, Rosa, José Luis, Pablo C., Mari, Oriol Ll., Marta O., Sonia, Marijo, Mónica, Nia, Xevi, Blanca, Patricia, Angel y Nuria por que creo que son todos ellos buenos compañeros y me han ayudado siempre que lo he necesitado.

También quiero agradecer a la unidad de trasplante cardiaco del Hospital de Santa Creu i Sant Pau porque sin ellos todo este trabajo no hubiera sido posible, y la ayuda de las personas encargadas del mantenimiento de los laboratorios y en especial de Flori, Carmen, Isabel y Fabio.

Además de la gente del ámbito científico muchas otras personas han contribuido a que esta tesis se haya escrito. En especial quiero destacar a Ruth y darle las gracias por ser la razón de esto y de todo lo demás. Sin ti esta tesis nunca se habría escrito. Muchas gracias por todos los momentos, tanto los buenos como los malos que siempre fueron buenos junto a ti. Además quiero agradecerte que me hayas ayudado con la ortografía de la tesis. Te quiero.

También quiero destacar a mis padres. Quiero darles las gracias por haberme hecho como soy y por todo su apoyo a lo largo de toda mi vida. Sólo espero que algún día estén la mitad de orgullosos de mí que yo lo estoy de ellos.

Agradecer todo al resto de mi familia y en especial a mis hermanas Mari, Montse, Katy y Sandra por haber soportado todos mis enfados, mis sermones científicos y mis "broncas". Alguna vez he pensado que debería ser divertido tener algún hermano en vez de tantas "chicas", pero seguro que a él no lo querría tanto, ni tampoco me hubiera cuidado tanto como me cuidan ellas. Debo agradecer también a los que son la alegría de mi vida, a mis sobrinos Lorena, Carlota, Tania, Marcos, Aitana, Sara, Joel y Álvaro. Sin ellos ni yo ni nadie seríamos los mismos. Me gustaría destacar también el apoyo que me han dado mis cuñados Toni, Pedro, Javi y Fran a lo largo de estos años.

Quiero agradecer a mi familia "política" la ayuda y el apoyo que me han dado desde que los conozco y formo parte de ellos. Por todo esto Juan, Mary Judith, Esther, David y Luis, muchas gracias.

Casi igual de importante que la familia es la amistad, y yo tengo la suerte de tener muchos y buenos amigos. Quiero agradecer a Daviki, Xavi, M^{re} Angeles, Mario, Pepe, Rafa, Robert, Mery, Dimas, Ricard, Alex, Esther y Ariadna por las

miles y miles de noches de discusiones filosófico-biológicas y por todos los buenos momentos pasados juntos. También agradecer a Oscar y Chica que siempre hayan estado allí sin esperar nada a cambio; y a Gonzalo, Idoia, José y Silvia las muchas tardes y las muchas noches que hemos pasado riendo y divirtiéndonos.

Por último quiero agradecer a la Fundación de Investigación Cardiovascular por la concesión de la beca predoctoral que me ha permitido realizar este trabajo.

A todos ellos GRACIAS.

Abreviaturas

AC:	Adenilato ciclasa
ACAT:	Acil-CoA-colesterol acil-transferasa
AP-1:	Proteína activadora 1
Apo:	Apolipoproteína
cAMP:	Adenosina-3',5'-monofosfato cíclico
CE:	Células endoteliales
CML:	Células musculares lisas
CoA:	Coenzima A
CRE:	Elemento de respuesta a cAMP
CREB:	Proteína de unión al elemento de respuesta de cAMP
Cyr61:	Proteína 61 rica en cisteína
DBD:	Dominio de unión al DNA
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
Edg:	Receptores de la familia del gen de diferenciación endotelial
eNOS:	Oxido nítrico sintasa endotelial
Erg-1:	Gen de respuesta al crecimiento temprano 1
ERK:	MAPK regulada por señales extracelulares
FGF-b:	Factor de crecimiento para fibroblastos básico
GAP:	Proteína activadora de la GTPasa
GDI:	Inhibidor del intercambio de nucleótido guanina
GDP:	Guanosina-5'-difosfato
GEF:	Factor de intercambio de nucleótidos de guanina
GPCRs:	Receptores acoplados a proteínas G
GTP:	Guanosina-5'-trifosfato
HAT:	Histona acetiltransferasa
HDL:	Lipoproteínas de alta densidad
HMG-CoA:	3-Hidroxi-3-metil-glutaril-CoA
ICAM:	Molécula de adhesión intercelular

IDL:	Lipoproteínas de densidad intermedia
IL-8:	Interleuquina 8
INFγ:	Interferon gamma
KID:	Dominio inducible por quinases
LBD:	Dominio de unión al ligando
LDL:	Lipoproteínas de baja densidad
LDLmox:	LDL mínimamente oxidadas
LDLox:	LDL oxidadas
LDLR:	Receptor de LDL
LPA :	Ácido lisofosfatídico
LXR:	Receptor hepático X
MAPK:	Proteína quinasa activada por mitógenos
MCP-1:	Proteína quimiotáctica de monocitos 1
M-CSF:	Factor estimulante de colonias de monocitos
MKK:	MAPK quinasa
MKKK:	MKK quinasa
MLC:	Cadena ligera de la miosina
NBRE:	Elemento de respuesta a NGFI-B
NO:	Óxido Nítrico
NOR-1:	Receptor nuclear huérfano derivado de neuronas
NRP-1 -2:	Neuropilin-1 -2
NuRE:	Elemento de respuesta a Nur77
Nurr1:	Gen relacionado con Nur77
PAI -1:	Inhibidor del activador del plasminógeno 1
PDGF:	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PIP₂:	Fosfatidil inositol-4,5-bifosfato
PIP₃:	Fosfatidil inositol-1,4,5-trifosfato
PKA:	Proteína quinasa A
PKC:	Proteína quinasa C
PLCβ:	Fosfolipasa C β
PIGF:	Factor de crecimiento de placentario

PPARs:	Receptores activados por proliferadores peroxisomales
PPARγ:	PPAR gamma
RAR:	Receptor del ácido retinoico
RNA pol II:	RNA polimerasa II
RNA:	Ácido ribonucleico
RNAm:	RNA mensajero
ROCK:	Rho quinasa
RXR:	Receptor del retinoide X
S1P:	esfingosina-1-fosfato
Ser:	Serina
SMembr:	Forma embrionica de la cadena pesada de la miosina
SREBP-2:	Proteína de unión al elemento de respuesta a esteroides
SRF:	Factor de respuesta a suero
TGF-β:	Factor de crecimiento transformante beta
Thr:	Treonina
TR:	Receptor de las hormonas tiroideas
VCAM:	Molécula de adhesión vascular
VDR:	Receptor de la vitamina D
VEGF:	Factor de crecimiento del endotelio vascular
VLDL:	Lipoproteínas de muy baja densidad

Índice

I. Introducción	1
1. <i>Aterosclerosis</i>	3
1.1 Inicio y evolución de las lesiones ateroscleróticas: Teoría inflamatoria-fibroproliferativa.....	5
1.2. Factores de riesgo.....	10
1.3 Endotelio vascular y aterosclerosis.....	11
1.3.1 Factor de crecimiento del endotelio vascular (<i>Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF</i>).....	11
1.4 Células musculares lisas y aterosclerosis.....	13
1.5 LDL.....	14
1.5.1 Regulación de la síntesis de colesterol por LDL.....	15
1.5.2 LDL y activación de CML.....	17
1.5.3 LDL y activación de las células endoteliales	18
1.5.4 Modelo porcino de hipercolesterolemia.....	18
2. <i>Vía de la síntesis del mevalonato y proteínas Rho</i>	19
2.1 Vía de síntesis del mevalonato.....	19
2.2 Proteínas Isopreniladas Rho.....	20
2.2.1 Regulación de la actividad de proteínas Rho.....	21
2.2.2 Modificaciones lipídicas y localización subcelular.....	22
2.2.3 RhoA.....	23
2.2.4 RhoA y ROCK.....	24
2.3 Estatinas.....	25
2.3.1 Efectos pleiotrópicos de las estatinas.....	26

3. <i>Receptores Nucleares</i>	28
3.1 Introducción.....	28
3.2 La superfamilia de los receptores nucleares.....	29
3.3 Estructura de los receptores nucleares.....	31
3.4 Regulación de la expresión génica por receptores nucleares	34
3.4.1 Coactivadores.....	34
3.4.2 Cofactores.....	35
3.4.3 Correpresores.....	35
3.4.4 Interacción de los receptores nucleares con las otras vías de transducción de señales.....	36
3.5 NOR-1.....	37
3.5.1 Unión al DNA.....	37
3.5.2 Estructura génica y proteica de NOR-1.....	38
4. <i>Mecanismos de transducción de señales</i>	41
4.1 Proteínas G heterotriméricas.....	41
4.2 Proteínas quinasas.....	42
4.2.1 Proteína quinasa A (PKA).....	42
4.2.2 Proteína quinasa C (PKC).....	43
4.3 Vía de las MAPK.....	43
4.4 CREB.....	44

II. Hipótesis y objetivos	47
III. Resultados	51
<i>Artículo 1: " Involvement of Neuron-derived Orphan Receptor-1 (NOR-1) in LDL-induced mitogenic stimulus in vascular smooth muscle cells: role of CREB"</i>	53
<i>Adendum al artículo 1</i>	61
<i>Artículo 2: "Simvastatin inhibits NOR-1 expression induced by hyperlipemia by interfering with CREB activation....."</i>	63
<i>Artículo 3: "NOR-1 is involved in VEGF-induced endothelial cell growth".....</i>	73
<i>Adendum al artículo 3</i>	81
IV. Resumen de resultados	83
V. Discusión	91
VI. Conclusiones	103
VII. Bibliografía	107

I. Introducción

1. Aterosclerosis

La aterosclerosis, la mayor causa de mortalidad en Europa, E.E.U.U. y gran parte de Asia (*Yusuf S. et al. 2001*), es la patología que subyace a la cardiopatía isquémica, la enfermedad cerebrovascular y las enfermedades de la circulación arterial periférica. Es una enfermedad inflamatoria, multifactorial, y progresiva, que se caracteriza por la acumulación en la capa íntima de las arterias de lípidos, elementos fibrosos, células [como células musculares lisas (CML), macrófagos y linfocitos T], y depósitos de calcio (*Fuster V. et al 1992, I y II*).

Las lesiones ateroscleróticas se forman principalmente en arterias musculares grandes y medianas (como las arterias coronarias y poplíteas) y en las arterias elásticas (como la aorta, las carótidas y las ilíacas) (*Slyper AH. 2004*). La pared arterial consta de tres capas bien diferenciadas morfológicamente: la íntima, la media y la adventicia (figura 1). La íntima está formada por el endotelio y una capa de tejido conjuntivo subendotelial. El endotelio, formado por células endoteliales, actúa como una barrera de permeabilidad selectiva a macromoléculas como las lipoproteínas, y a células como los monocitos o los linfocitos circulantes. Además, ejerce otras muchas funciones: participa en la regulación del tono vascular, actúa como superficie antitrombótica, y participa en procesos inflamatorios (*Badimon L, Martinez-Gonzalez J. 2002*). El subendotelio da soporte al endotelio y está constituido básicamente, por una matriz de proteoglicanos y colágeno.

La íntima y la media están separadas por la elástica interna, formada por una malla compacta de elastina. La media es la capa de mayor grosor, está formada por CML, su principal función es la de mantener el tono de la pared arterial, por ello las CML poseen un citoesqueleto rico en actina y miosina.

La capa más alejada de la luz del vaso es la adventicia, que está formada por tejido conectivo y fibroblastos y está separada de la media por la lámina elástica externa. En la adventicia nos encontramos con vasos de pequeño calibre denominados “vasa vasorum”, que ocasionalmente penetran en la media, y cuya

función esta relacionada con el aporte de nutrientes y oxígeno a las capas más profundas de la pared. (Moreno PR, et al. 2004).

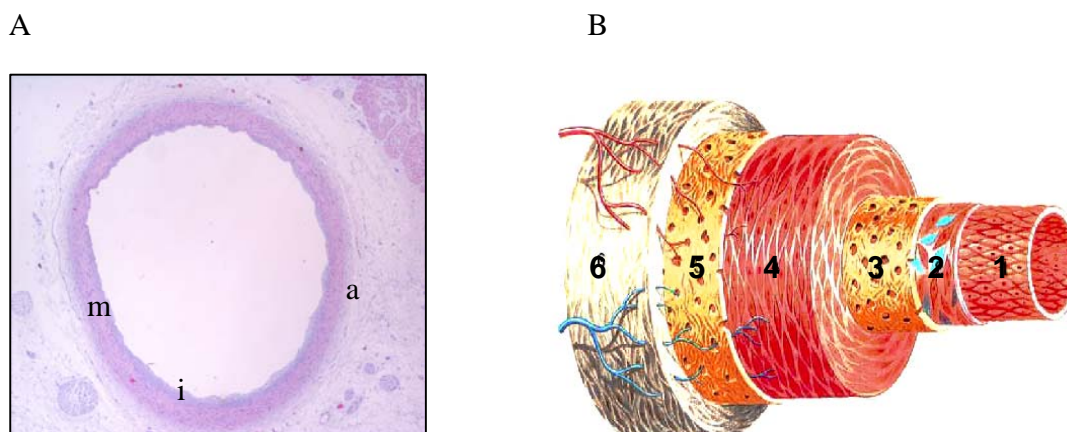


Fig 1. A) Corte transversal de una arteria coronaria donde podemos observar claramente las tres capas diferenciadas: (i=íntima; m=media; a=adventicia). B) Esquema de una sección transversal de una arteria elástica: 1- Células endoteliales, 2- Subendotelio, 3- Lámina elástica interna, 4-Células musculares lisas, 5- Lámina elástica externa, 6- Adventicia

Se han formulado diferentes teorías para explicar el proceso de inicio y evolución de las lesiones ateroscleróticas. Las dos principales teorías a lo largo del siglo pasado fueron la trombogénica y la lipídica. La teoría lipídica sugería que la acumulación de lípidos en las arterias era la causa fundamental de la formación de las lesiones ateroscleróticas. Esta teoría se basaba en los experimentos pioneros de Anitskchow y Chaladow en 1913, en los cuales se producía lesión aterosclerótica en conejos alimentados con una dieta rica en colesterol. La teoría trombogénica, de Carl von Rokitansky en 1852, sugiere que la causa principal del inicio de la lesión sería la deposición de fibrina con la subsiguiente organización, y de forma secundaria se produciría un acúmulo de lípidos. En la actualidad, se ha producido una integración y ampliación de estas dos teorías y se considera que la aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria-fibroproliferativa crónica (Badimon J.J. et al. 1993).

1.1 Inicio y evolución de las lesiones ateroscleróticas: Teoría inflamatoria-fibroproliferativa.

El desarrollo de una lesión aterosclerótica no es un proceso continuo, sino que se producen alternancias entre momentos de rápida evolución y períodos de relativa estabilidad. En el desarrollo de la lesión podemos distinguir las siguientes fases:

a) Lesión Inicial: La alteración de las funciones vasoprotectoras del endotelio, causada por exposición de éste a diferentes factores de riesgo, juega un papel importante en el inicio de las lesiones ateroscleróticas. Las lesiones se producen con más facilidad en segmentos de la arteria ramificados o curvados, en los que la pérdida del flujo laminar modifica la función endotelial. En estas regiones las células endoteliales están más “desorganizadas”, y adoptan una morfología poligonal, sin ninguna orientación particular, que favorece la entrada al subendotelio de macromoléculas, como las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y células, como los monocitos (*Lusis AJ. 2000*). Además, una concentración plasmática alta de LDL, favorece la entrada de las lipoproteínas en estas zonas, acumulándose en el subendotelio y facilitando el inicio de la lesión aterosclerótica (*Ross R. 1999*). En el subendotelio las LDL son retenidas por la matriz de proteoglicanos, debido a interacciones entre la apolipoproteína B (ApoB) de las LDL y los componentes de la matriz (*Gustafsson M. et al. 2004*). Las LDL retenidas son *per se* un estímulo proinflamatorio, pero pueden sufrir modificaciones como la oxidación, la lipólisis, la proteólisis, la glicosilación y la agregación que incrementan su aterogenicidad (*Lusis AJ. 2000*). Una de las modificaciones de las LDL más estudiadas es la oxidación. Inicialmente se produce una leve oxidación de las LDL que afecta básicamente a los ácidos grasos y se forman las denominadas LDL mínimamente oxidadas (LDL_{mox}), que en sí mismas son un importante estímulo proinflamatorio (figura 2).

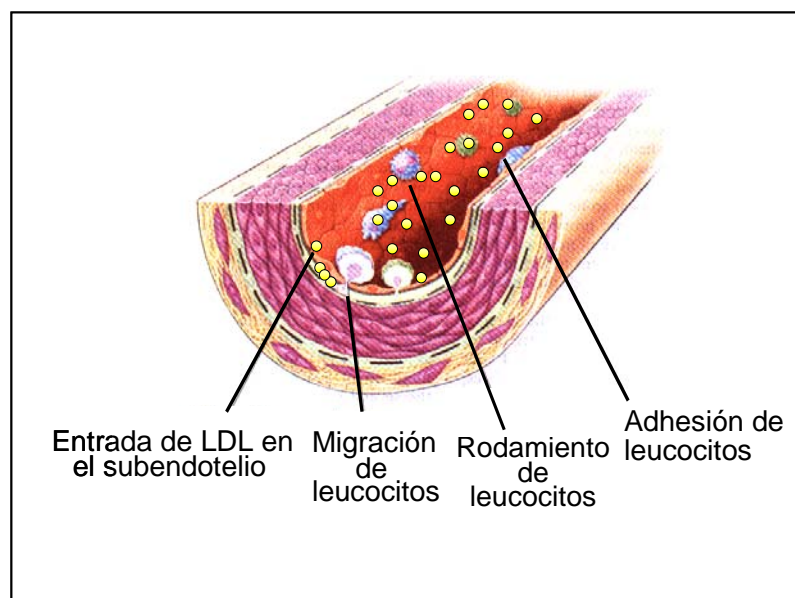


Fig 2. Inicio de la lesión aterosclerótica: Niveles elevados de LDL circulantes favorecen que éstas se acumulen en el subendotelio donde desencadenan una respuesta inflamatoria que hace que el endotelio favorezca la adhesión y migración de monocitos y linfocitos T al subendotelio. Adaptado de Ross R. 1999

b) Inflamación: Las LDL_{ox} estimulan la síntesis de moléculas proinflamatorias y la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio. Entre estas moléculas destacan la P- y E-Selectina que favorecen la etapa inicial de la adhesión de los monocitos, denominada “rodamiento” (Dong ZM. et al. 1998). También se induce la expresión de la molécula de adhesión intercelular (*InterCellular Adhesion Molecule*, ICAM) y la molécula de adhesión vascular (*Vascular Cell Adhesion Molecule*, VCAM) que permiten la unión de los monocitos a las células endoteliales (Collins RG. et al. 2000). Además, las LDL_{ox} también inducen la síntesis de factores quimiotácticos como la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (*monocyte chemoattractant protein-1*, MCP-1), o la interleuquina-8 (*interleukin-8*, IL-8) (Boisvert WA. 2004), que permite la atracción, la adhesión y la migración de monocitos y linfocitos T a través del endotelio por diapédesis. En el subendotelio, los monocitos se diferencian a macrófagos y expresan receptores *scavenger* (basureros), cuya expresión es inducida por citoquinas como el factor estimulante

de las colonias de monocitos (*macrophage colony-stimulating factor*, M-CSF), sintetizado por células endoteliales en respuesta a las LDL oxidadas (LDLox). Los receptores *scavenger* permiten a los macrófagos la captación de LDL modificadas (como LDLox). La secreción de citoquinas por los linfocitos T activados, también contribuye a la respuesta inflamatoria (Lusis AJ. 2000).

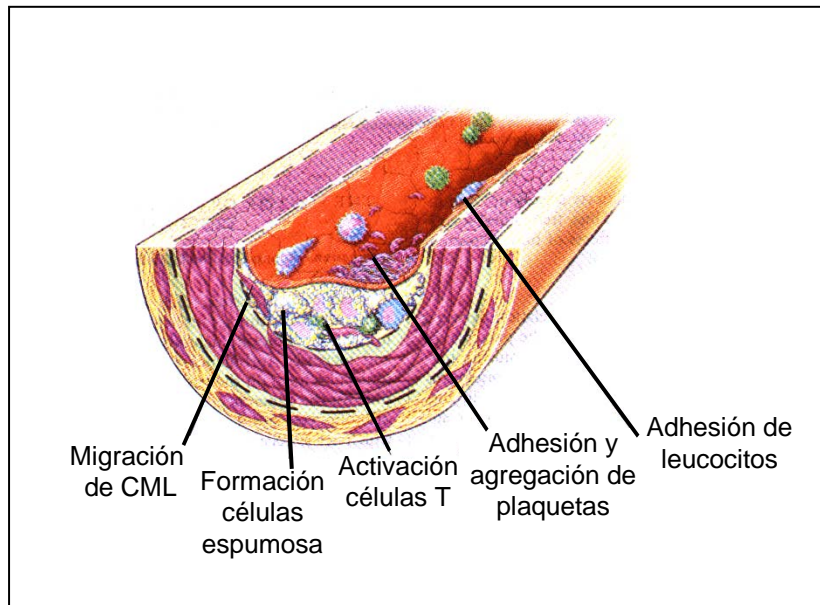


Fig 3. Formación de estría grasa: Las citoquinas y factores quimiotácticos liberados por el endotelio activan a los linfocitos T y hacen que los macrófagos expresen receptores *scavenger* a través de los cuales captan LDL modificadas lo que hace que se transformen en células espumosas. Estas células espumosas sintetizan citoquinas y ROS, lo que aumenta la oxidación de las LDL y facilita su captación por los macrófagos, además estimulan la migración de las CML desde la media a la íntima. Adaptado de Ross R 1999.

c) Formación de células espumosas y estría grasa: Los macrófagos y las células endoteliales activadas producen especies reactivas de oxígeno (ROS) y enzimas de tipo mieloperoxidasas, esfingomielinasa y fosfolipasas, que modifican en gran medida a las LDL (Lusis AJ. 2000). Estas LDL son captadas por macrófagos a través de los receptores *scavenger* (receptor *scavenger* clase A [SR-A], receptor *scavenger* CD36 y receptor *scavenger* CD68). La expresión de estos receptores *scavenger* está regulada por factores de transcripción que responden a lípidos oxidados, como es el caso del receptor activado por proliferadores peroxisomales gamma (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-*

gamma, PPAR γ) (Nicholson AC. 2004). Los macrófagos acumulan grandes cantidades de ésteres de colesterol y sufren unos cambios fenotípicos que les dan un aspecto espumoso, es por ello que se les ha denominado células espumosas. Las propias células espumosas producen ROS y factores de crecimiento como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (*platelet-derived growth factor*, PDGF), el factor de crecimiento para fibroblastos básico (*basic fibroblast growth factor*, FGF-b) y el factor de crecimiento transformante beta (*transforming growth factor beta*, TGF- β) que aumentan así la inflamación local y la respuesta proaterogénica (Libby, P. 2002). Estas citoquinas inducen un aumento de la migración de las CML desde la media a la íntima y estimulan su proliferación.

Las CML también pueden captar LDLox y transformarse en células espumosas. La formación de células espumosas y la proliferación de CML en la íntima, provocan el engrosamiento de la pared arterial que da origen a la estría grasa (figura 3). En la mayoría de los países desarrollados este tipo de lesión aparece a edad muy temprana (infancia y adolescencia) (Ross R. 1999).

d) Placa Fibrosa: Las CML proliferan en la íntima y secretan matriz extracelular (elastina, colágeno y proteoglicanos) en respuesta a diferentes factores de crecimiento (Katsuda S, et al. 2003). La matriz extracelular sintetizada por CML se organiza formando una “cápsula fibrosa” que cubre el núcleo de la lesión constituido por células espumosas. La carga lipídica de las células espumosas es tóxica para las células que pueden experimentar apoptosis o necrosis, la cuál es estimulada por citoquinas proapoptóticas y elementos oxidativos del microambiente de la placa. La muerte celular de las células espumosas origina un “núcleo lipídico” compuesto por colesterol extracelular y restos celulares (Stoneman VE, et al. 2004) (figura 4).

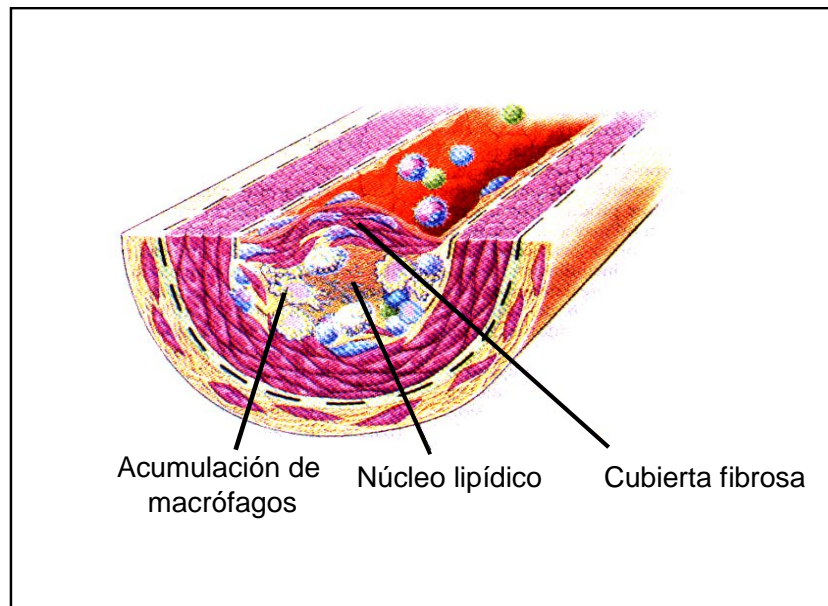


Fig 4. Formación de la placa fibrosa: Migración, proliferación y síntesis de matriz extracelular por parte de las CML, formando la cubierta fibrosa que recubre el núcleo lipídico formado por gran cantidad de colesterol extracelular derivado de células espumosas apoptóticas o necróticas. Adaptado de Ross R. 1999.

e) Lesión avanzada y trombosis: Una placa puede romperse o ulcerarse y provocar la formación de un trombo que puede causar un evento coronario agudo (Badimon L. et al. 1991). Las placas con una cubierta fibrosa delgada y un elevado número de células inflamatorias son más propensas a romperse. El mantenimiento de la cubierta fibrosa depende del equilibrio entre la formación (por CML) y la destrucción de matriz extracelular. En este proceso juegan un papel importante las células inflamatorias. Por ejemplo los linfocitos T producen interferón gamma (*interferon gamma*, IFN- γ) que inhibe la síntesis de matriz extracelular, y los macrófagos sintetizan proteasas (colagenasas, gelatinasas, catepsinas...) que degradan la matriz extracelular.

Las placas presentan una estructura excéntrica y su ruptura se produce en el lugar denominado "hombro" (*shoulder*) de la placa (Badimon L et al 1992). Esta zona es rica en macrófagos y pobre en CML y matriz extracelular. El trombo que se forma al romperse la cubierta fibrosa se debe a que se expone a la circulación numerosos elementos protrombóticos presentes en el núcleo lipídico (figura 5) (Badimon L. et al. 2004^[1], Badimon L. et al. 2004^[2]).

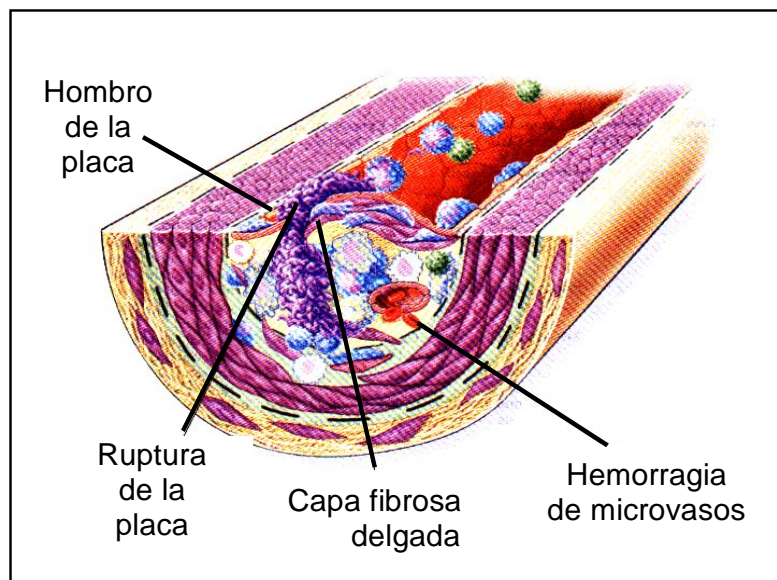


Fig 5. Ruptura de la placa fibrosa. La formación de un trombo se produce por la pérdida de la cubierta fibrosa, sobretudo en los lugares donde hay menos matriz extracelular, y la consiguiente exposición a la circulación de sustancias protrombóticas. También las pequeñas hemorragias que se producen en los vasos formados por angiogénesis en la placa son causa de formación de trombos. Adaptado de Ross R 1999

1.2 Factores de riesgo:

A partir de los estudios realizados durante décadas en diferentes países, principalmente E.E.U.U., se han identificado muchos de los factores de riesgo responsables de la aterosclerosis. Dentro de estos factores destacan los relacionados con el metabolismo lipídico (dislipemias), que parecen ser determinantes en el desarrollo de la aterosclerosis y que en gran medida, tienen su origen en alteraciones genéticas moduladas por factores ambientales. Los niveles altos de LDL favorecen el desarrollo de la enfermedad. De hecho, en modelos animales la forma de inducir lesiones de características similares a las detectadas en humanos, es principalmente mediante la administración de dietas hipercolesterolémicas. Sin embargo, aproximadamente la mitad de personas afectadas de aterosclerosis tienen niveles normales de LDL (*Braunwald E. 1997*).

Esto subraya la importancia de otros factores involucrados en la aterosclerosis como son la hipertensión arterial, las concentraciones altas en plasma de homocisteína, la diabetes mellitus, el tabaquismo, la baja concentración de HDL, y diversas alteraciones génicas e infección de microorganismos como puede ser herpesvirus o *Chlamydia pneumoniae*, que participan del desarrollo de la enfermedad (Ross R. 1999).

1.3 Endotelio vascular y aterosclerosis.

El endotelio vascular reviste los vasos sanguíneos, y actúa de interfase entre los componentes circulantes (células y macromoléculas) y los tejidos. Posee una gran superficie y se le considera un verdadero órgano que participa de un elevado número de funciones entre las cuales encontramos la regulación de la permeabilidad vascular, el tono vascular, la cicatrización, y la hemostasis. El endotelio es un órgano regulador de forma que puede realizar tanto funciones sensoriales como efectoras. Es por ello que presenta una gran gama de receptores para citoquinas, quimiotácticos, péptidos y lípidos vasoactivos; además, puede sintetizar moléculas reguladoras del tono vascular (Badimon L. et al. 2002).

El endotelio sufre cambios físicos, químicos y fisiológicos en su entorno que se traducen en una respuesta biológica a estos. Cuando estos cambios superan la capacidad reguladora del endotelio se producen procesos como la agregación plaquetaria, la trombosis, la inflamación, la vasoconstricción o el incremento de la permeabilidad vascular, y hablamos de disfunción endotelial. Existen numerosos factores de riesgo aterogénicos que producen disfunción endotelial, tanto factores bien caracterizados como las concentraciones altas de LDL, el tabaquismo, la diabetes y la hipertensión; como factores emergentes como la hiperhomocisteinemia, las infecciones, o el déficit estrogénico (Drexler H. 1997).

1.3.1 Factor de crecimiento del endotelio vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF*)

El VEGF es una citoquina que estimula diferenciación, supervivencia, migración,

proliferación, angiogénesis y la permeabilidad vascular en células endoteliales, además de tener diferentes efectos pleiotrópicos en otras células y tejidos. VEGF A (en adelante VEGF) es el miembro prototipo de esta familia de factores de crecimiento que incluyen entre otros: VEGF B, C, D, E y el factor de crecimiento de placentario PIGF (*placenta growth factor*). Existen diferentes isoformas de VEGF de 121, 145, 165, 189 y 206 residuos de aminoácidos. La isoforma más abundante y presumiblemente con mayores efectos biológicos es la VEGF₁₆₅ (*Petrova TV. et al. 1999*).

La acción de los miembros de la familia de VEGF está mediada por una familia de receptores del tipo tirosina-quinasa que consta de tres miembros: Flt1/VEGFR1, KDR/VEGFR2 y Flt4/VEGFR3 (*Petrova TV. et al. 1999*). Estos receptores pertenecen a la clase III de la subfamilia del receptor del PDGF, el cuál se caracteriza por la presencia de siete dominios homólogos a la inmunoglobulina, y por poseer un dominio intracelular con actividad tirosina-quinasa. Estos receptores se expresan básicamente en células endoteliales aunque se pueden encontrar en otras células como macrófagos, plaquetas, monocitos y megacariocitos. Los diferentes miembros de la familia de proteínas de VEGF se unen a receptores concretos, así por ejemplo al VEGFR1 se le unen los miembros VEGF-A y -B, y PIGF; a VEGFR2 se unen VEGFA, -C, -D y -E; y a VEGFR3 se unen VEGF C y -D (*Petrova TV. et al. 1999*).

Además, también se ha observado que algunos miembros de la familia de proteínas de VEGF son capaces de unirse a receptores, inicialmente descritos en el extremo de los axones de ciertas neuronas, que se denominan Neuropilin-1 (NRP-1) y Neuropilin-2 (NRP-2). A NRP-1 se unen VEGF₁₆₅, PIGF, VEGF-B y -E; mientras que a NRP-2 se unen VEGF₁₄₅, PIGF y VEGF C. Este receptor, por unión a semaforinas, puede controlar el crecimiento del axón de la neurona durante el desarrollo embrionario. Se ha observado la presencia de NRP-1 en células endoteliales de vasos sanguíneos y diferentes estudios muestran que es importante para la angiogénesis, donde parece jugar un papel de co-receptor interaccionando con el VEGFR-2, y aumentando la respuesta migratoria y proliferativa de la célula al VEGF₁₆₅ (*Neufeld G. et al. 2002*).

En las células endoteliales, la mayoría de señalizaciones biológicamente relevantes del VEGF son mediadas por VEGFR-2. VEGFR-2 se activa por dimerización inducida por ligando y mediante una autofosforilación en los residuos tirosina del dominio citoplasmático. Una vez activado VEGFR-2 se pueden producir diferentes respuestas celulares que van desde la supervivencia y migración de la célula, hasta la activación de una respuesta mitogénica. Para producir esta respuesta, VEGFR-2 activa diferentes vías de señalización, entre ellas la movilización de calcio, proteínas quinasas C (*Protein kinase C, PKC*), tanto las clásicas como las no clásicas, y proteínas quinasas activadas por mitógenos (*mitogen-activated protein kinase, MAPK*), como las proteínas quinasas reguladas por señales extracelulares (*extracellular signal-regulated kinases, ERK*) y p38 MAPK. También se ha observado que VEGF es capaz de activar la proteína de unión al elemento de respuesta de cAMP (*cAMP response element binding protein, CREB*) a través de la fosforilación en Ser¹³³ (Mayo LD. et al. 2001).

1.4 Células musculares lisas y aterosclerosis.

La principal función de las células musculares lisas (CML) es la de mantener el tono vascular. En condiciones normales, las CML de un vaso sanguíneo adulto muestran una baja actividad proliferativa y sintética, siendo su principal función mantener el tono vascular (Owens GK. et al. 2004). Pero estas características se alteran durante el desarrollo, en la reparación de un vaso sanguíneo, o en la enfermedad vascular. Por ejemplo, se ha observado que los procesos de síntesis de matriz extracelular y la actividad proliferativa están muy acelerados durante el desarrollo del sistema vascular, en el remodelado de un vaso después de una lesión y en la aterosclerosis. En estos casos las CML se activan y sufren un cambio fenotípico. Migran desde la media hasta la íntima donde proliferan y sintetizan matriz extracelular según los factores presentes en el medio.

La migración a la íntima y la proliferación de las CML se sabe que juega un papel crucial en el desarrollo de la enfermedad aterosclerótica. Para que se produzca esta migración se debe inducir un proceso de activación de las CML. La activación puede efectuarse por diferentes factores de crecimiento como son

PDGF, FGF-b, y TGF- β (Ross R. 1999). Estas moléculas son secretadas por células endoteliales activadas por macrófagos, células espumosas y linfocitos T que se encuentran en la lesión.

Algunos factores de riesgo de la enfermedad aterosclerótica pueden actuar como activadores de las CML. Por ejemplo, una concentración elevada de homocisteína no solo daña a las células endoteliales, sino que también produce activación de las CML (Rasmussen LM. et al. 2004). También se ha observado que las LDL producen eventos relacionados con el crecimiento de CML, entre ellos síntesis de DNA y regulación de factores de crecimiento clave (ver apartado 1.5.2) (Sachinidis A. et al. 1993; Libby P. et al. 1985).

Las CML pueden tener diferente papel en la evolución de la aterosclerosis. Por un lado participan en la formación del engrosamiento de la pared arterial, y tienen un papel clave en patologías como la restenosis post-angioplastia. En estos casos se produce un engrosamiento de la íntima que puede producir la obstrucción del vaso. Pero por otro lado las CML sintetizan matriz extracelular (colágeno, elastina, glucoproteínas, proteoglicanos, etc...) (Katsuda S, Kaji T. 2003) que forma una cubierta fibrosa que da resistencia a la placa. Además las CML son capaces de sintetizar sustancias que regulan la actividad contráctil del vaso, así como factores que regulan la inflamación, la proliferación, la apoptosis y la estructura de la matriz. Por todo ello el papel que juegan las CML en la aterosclerosis es complejo y seguramente puede variar según el estado y tipo de lesión.

1.5 LDL

Las lipoproteínas son macromoléculas que se encargan del transporte de lípidos a los tejidos. Las lipoproteínas están compuestas por una parte lipídica y otra proteica constituida por una o más apolipoproteínas (Apo). Las Apo se encargan de la regulación de las interacciones de las lipoproteínas y tienen función estructural. La parte lipídica está compuesta tanto por lípidos totalmente hidrofóbicos (triglicéridos, ésteres de colesterol) situados en la parte central de la lipoproteína, como por lípidos anfipáticos (fosfolípidos y colesterol) situados en el exterior de la partícula (figura 6).

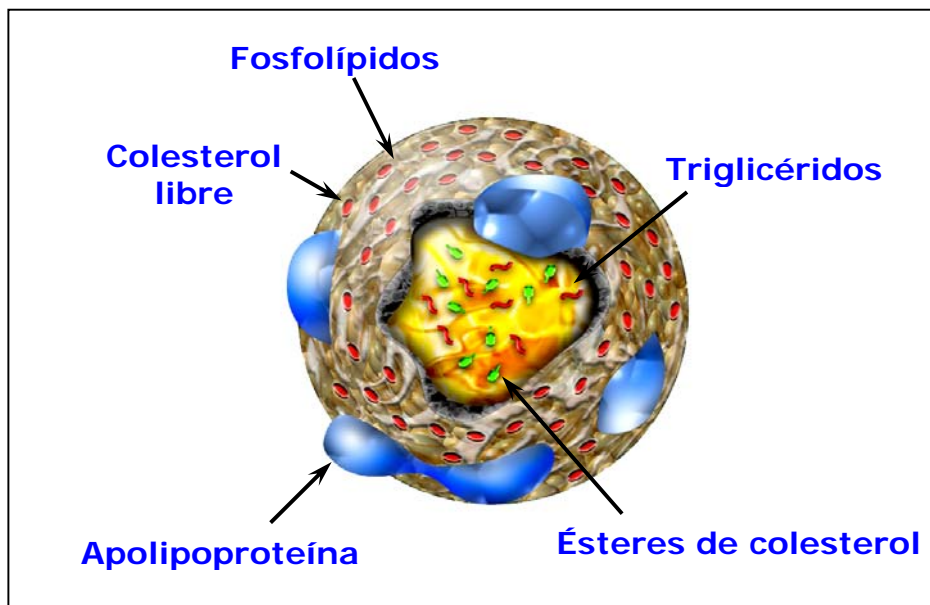


Fig 6. Estructura de una lipoproteína: *Las lipoproteínas están constituidas por proteínas (Apolipoproteína), y una parte lipídica. Dentro de la fracción lipídica encontramos lípidos anfipáticos (colesterol libre y fosfolípidos) y lípidos hidrofóbicos (ésteres de colesterol y triglicéridos).*

Según su densidad, las lipoproteínas se clasifican en: quilomicrones y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL), y lipoproteínas de alta densidad (HDL). A su vez dentro de cada una de estas clases encontramos diferentes subclases de lipoproteínas según la densidad de la partícula que varía a lo largo de su metabolismo.

1.5.1 Regulación de la síntesis de colesterol por LDL

Las LDL son unas de las principales lipoproteínas involucradas en aterosclerosis. Las LDL se forman a partir de las VLDL y están constituidas por una única lipoproteína que es la ApoB-100. Las LDL se encargan del transporte de colesterol a los tejidos periféricos, colesterol necesario para la formación de membrana plasmática, hormonas esteroidales y sales biliares en el hígado. Para conseguir colesterol las células tienen dos posibilidades, una es realizar autosíntesis de colesterol, y la otra mediante la captación de LDL. Para ello las células poseen receptores de apo B/E, también denominado receptor de LDL (LDLR), que son capaces de interactuar con las lipoproteínas e internalizarlas. Los LDLR están dispuestos en depresiones de la membrana celular recubiertos con una proteína

denominada clatrina. Cuando la LDL interacciona (a través de la ApoB-100) con el receptor se estructura una vesícula que origina un endosoma que posteriormente se fusiona con lisosomas, cuyas enzimas hidrolíticas degradan la apoB-100 y los ésteres de colesterol. El colesterol libre formado puede ser utilizado para integrarse en las membranas celulares o ser almacenado como ésteres de colesterol por acción del enzima acil-CoA-colesterol acil-transferasa (ACAT). El aumento de colesterol en la membrana inhibe la activación de un factor de transcripción denominado proteína de unión al elemento de respuesta a esteroides 2 (*sterol response element binding protein-2*, SREBP-2). SREBP-2 controla diferentes genes involucrados en la vía de la síntesis de colesterol, como el de la 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A (HMG-CoA) reductasa o el del LDLR, de forma que se regula el contenido del colesterol intracelular (Brown M.S., Goldstein J.L. 1997) (Figura 7). Este mecanismo es muy activo en el hígado que es el principal órgano que sintetiza colesterol y que actúa regulando los niveles de colesterol circulante (Lasunción M.A. 2003)

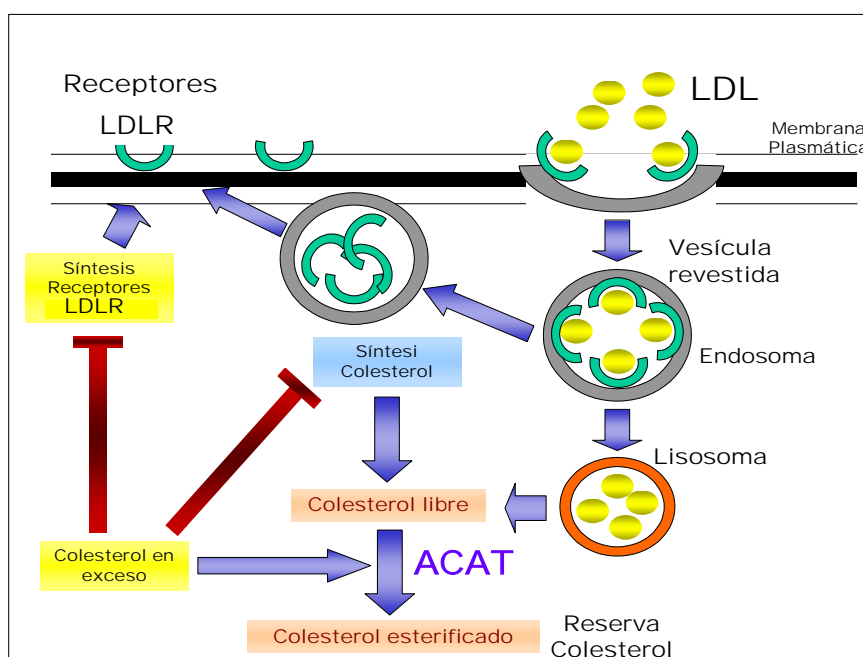


Fig 7 Metabolismo de las LDL: La interacción de las LDL con los LDLR de las células produce una vesícula que se fusiona con lisosomas. Las lipoproteínas se hidrolizan generando colesterol libre para su utilización en membrana o para su almacenaje como ésteres de colesterol. Los LDLR son reciclados a membrana y se produce la inhibición tanto de la síntesis de LDLR como de la HMG-CoA reductasa, enzima clave en la síntesis de colesterol.

1.5.2 LDL y activación de CML.

Uno de los principales factores de riesgo aterosclerótico es la hipercolesterolemia. Una alta concentración de LDL plasmática, favorece que se infiltren en la pared vascular y ello promueva una respuesta inflamatoria. Las LDL nativas *per se* pueden activar las CML actuando como factores de crecimiento que inducen diferentes vías de transducción de señales (*Libby P. et al 1985*) (*Gouni-Berthold I, Sachinidis A. 2004*). Las LDL pueden aumentar las concentraciones intracelulares de calcio (*Sachinidis A. et al. 1990*), estimular el metabolismo de fosfoinositoides y la translocación a la membrana de la PKC (*Scott-Burden T. et al. 1989*), activar la vía de ERK (*Sachinidis A. et al. 1997*) y regular la actividad de factores de transcripción como la proteína activadora-1 (*activator protein-1, AP-1*) (*Zhu Y. et al. 1998*). Algunos de estos efectos se producen a través de proteínas G sensibles a toxina pertusis (*Sachinidis A. et al 1997*) e independientes del receptor clásico de las LDL (*Metzler B. et al 1999*). Las proteínas G normalmente transducen la señal desde receptores con 7 dominios transmembrana denominados receptores acoplados a proteínas G (*G-protein coupled receptors, GPCR*). El mecanismo por el cual las LDL pueden activar estos receptores no está muy claro, aunque podría ser que alguno de sus componentes interactuara con ellos. A favor de esta hipótesis encontramos la presencia de GPCRs pertenecientes a la familia del gen de diferenciación endotelial (*endothelial differentiation gene, Edg*), los cuales son receptores para la esfingosina-1-fosfato (S1P) (componente de las LDL) La activación de receptores Edg transmite señales intracelulares a través de proteínas G (G_i y G_q) y proteínas G pequeñas (Rho), que activan la proliferación y la migración de las CML (*Xu CB. et al. 2004, Sanchez T, Hla T. 2004*). También existen receptores GPCRs para el ácido lisofosfatídico (LPA) (presente en LDL_{ox}) (*Siess W, Tigyi G. 2004*) que transmiten señales de proliferación en CML a través de las proteínas G pequeñas Cdc42 y Rac (*Schmitz U. et al. 2002*).

1.5.3 LDL y activación de las células endoteliales

Las LDL inducen efectos mitogénicos sobre las células endoteliales como la expresión del gen de respuesta al crecimiento temprano (*early growth response gene-1*, *Erg-1*) (Ko Y. et al. 1995), o la activación de factores de transcripción como AP-1 (Zhu Y. et al. 1998) y de vías como la p38 MAPK (Zhu Y. et al 2001).

Las LDL también activan la respuesta proaterogénica de las células endoteliales aumentando la producción del inhibidor del activador del plasminógeno 1 (*plasminogen activator inhibitor-1*, PAI-1) (Camera M. et al. 1993) e inhibiendo la óxido nítrico sintasa (*endothelial nitric oxide synthase*, eNOS) (que regula la producción de NO) (Vidal F. et al. 1998, Pritchard KA. et al. 2002), o la lisil oxidasa que contribuye a estabilizar las lesiones (Rodríguez C. et al. 2003).

Recientemente se ha descrito que las LDL producen un aumento de la expresión del factor de crecimiento VEGF y de su receptor VEGFR-2. Un aumento de VEGF/VEGFR-2 puede contribuir al desarrollo de la placa aterosclerótica, produciendo un incremento de la permeabilidad e induciendo angiogénesis en lesiones avanzadas (Rodríguez JA. et al. 2005).

1.5.4 Modelo porcino de hipercolesterolemia

La utilización de modelos de animales ha ayudado enormemente a la comprensión de los mecanismos implicados en la patología aterosclerótica, así como a la elaboración de estrategias terapéuticas.

El cerdo es un buen modelo para estudiar la aterosclerosis, porque presenta muchas similitudes a los humanos en su sistema cardiovascular: estructura de los vasos, niveles de lipoproteínas, y además desarrolla lesiones ateroscleróticas de manera espontánea (Kim DN et al. 1984). Debido a esto, en los últimos años se ha multiplicado el número de trabajos que utilizan el cerdo como modelo de aterosclerosis (Raposo B. et al. 2004; Badimon L. et al. 1999).

2. Vía de la síntesis del mevalonato y proteínas Rho

2.1 Vía de síntesis del mevalonato

La mayoría del colesterol transportado en plasma, procede de la síntesis a nivel hepático. La síntesis de colesterol a partir de acetyl-CoA se produce a través de un gran número de reacciones enzimáticas en la denominada vía del mevalonato. Entre estas reacciones destaca la conversión del HMG-CoA a mevalonato, reacción catalizada por el enzima HMG-CoA reductasa (*Goldstein JL, Brown MS. 1990*) (figura 8). Este enzima es clave ya que es el principal regulador de la vía mediante un mecanismo de retroalimentación negativa. El aumento de colesterol intracelular inhibe la HMG-CoA reductasa lo que hace que se reduzca su síntesis (ver apartado 1.5.1).

Además del colesterol, existen otros productos de la vía como la ubiquinona, el dolicol, el farnesilpírofosfato y el geranilgeranilpírofosfato que son necesarios para la activación de las proteínas farnesiladas y geranilgeraniladas, y el isopentenil adenosina. Estos productos de la vía son esenciales para la célula y su síntesis se ve afectada por la regulación de la HMG-CoA reductasa (figura 8).

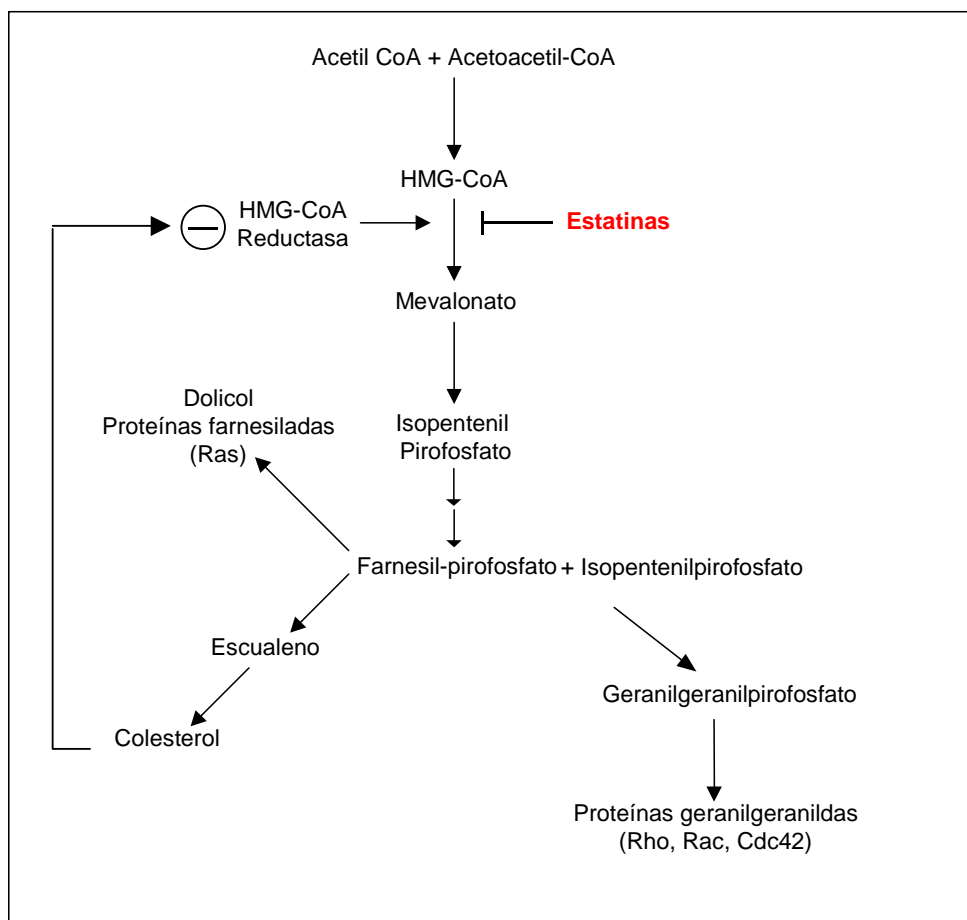


Fig. 8 . Vía de síntesis del mevalonato. Inhibición de la HMG-CoA reductasa por estatinas y por un mecanismo de retroalimentación negativa del colesterol. Síntesis de colesterol e isoprenoides

2.2 Proteínas Isopreniladas Rho

Es una familia de proteínas monoméricas que pertenecen a la superfamilia de proteínas Ras y que se caracterizan porque pueden unir e hidrolizar GTP. Estas proteínas son capaces de ciclar entre un estado activo (unidas a GTP), y uno inactivo (unidas a GDP). De este modo actúan como “interruptores” moleculares para controlar procesos celulares complejos (*Etienne-Manneville S, Hall A. 2002*).

La familia de proteínas Rho está constituida por seis subfamilias diferentes: las proteínas relacionadas con RhoA y las relacionadas con Rac-1, Cdc42, Rnd, RhoBTB y Miro (*Wennerberg K. et al. 2004*). Han sido descritas alrededor de 25 proteínas Rho. RhoA fue descubierta en 1985 como una proteína relacionada con la superfamilia de proteínas Ras (*Madaule P. et al. 1985*). A partir de ese momento

diferentes estudios demostraron que Rho, Cdc42 y Rac (tres de las proteínas Rho mejor estudiadas) estaban involucradas en vías de señalización a través de las cuales receptores de membrana modifican la organización de filamentos de actina. Por ello las proteínas Rho están involucradas en procesos celulares relacionados con el citoesqueleto como son la polaridad celular, el dinamismo microtubular y el transporte vesicular. Sin embargo Rho, también participa en diferentes procesos enzimáticos y en la regulación de la expresión génica.

2.2.1 Regulación de la actividad de proteínas Rho.

Las proteínas Rho se pueden encontrar en dos estados diferentes, unidas a GTP o a GDP (figura 9), que están regulados por tres proteínas que son:

- GEF (*Guanine nucleotide Exchange Factor*): factor de intercambio de nucleótido guanina. Cataliza el intercambio de nucleótidos GDP por GTP. Se conocen alrededor de 69 GEFs en mamíferos. Son los responsables directos de la activación de las proteínas de la familia Rho en respuesta a diferentes estímulos extracelulares (*Rossmann KL. et al. 2005*).
- GAP (*GTPase-Activating Protein*): proteína que activa la capacidad intrínseca de la proteína Rho para hidrolizar GTP. Actualmente se conocen 70 proteínas GAPs en mamíferos.
- GDI (*Guanine nucleotide exchange Inhibitor*): Inhibidor del intercambio de nucleótido guanina. Impide que se produzca el intercambio GDP-GTP y también el traslado de la proteína Rho a membrana. Se han encontrado 4 GDIs en mamíferos.

En una situación general, en células no estimuladas, la mayoría de proteína Rho se encuentra distribuida en el citoplasma unida a GDI. Cuando se estimula la célula, Rho se separa de GDI, requisito indispensable para translocarse a la membrana (*Olofsson B. 1999*) y activarse gracias a la acción de GEF que cataliza el intercambio entre GDP-GTP. Unido a GTP Rho es activo y capaz de interactuar con sus efectores transmitiendo la señal. Cuando interviene

GAP se pone en marcha la actividad hidrolasa intrínseca en Rho obteniendo Rho-GDP inactivo (figura 9).

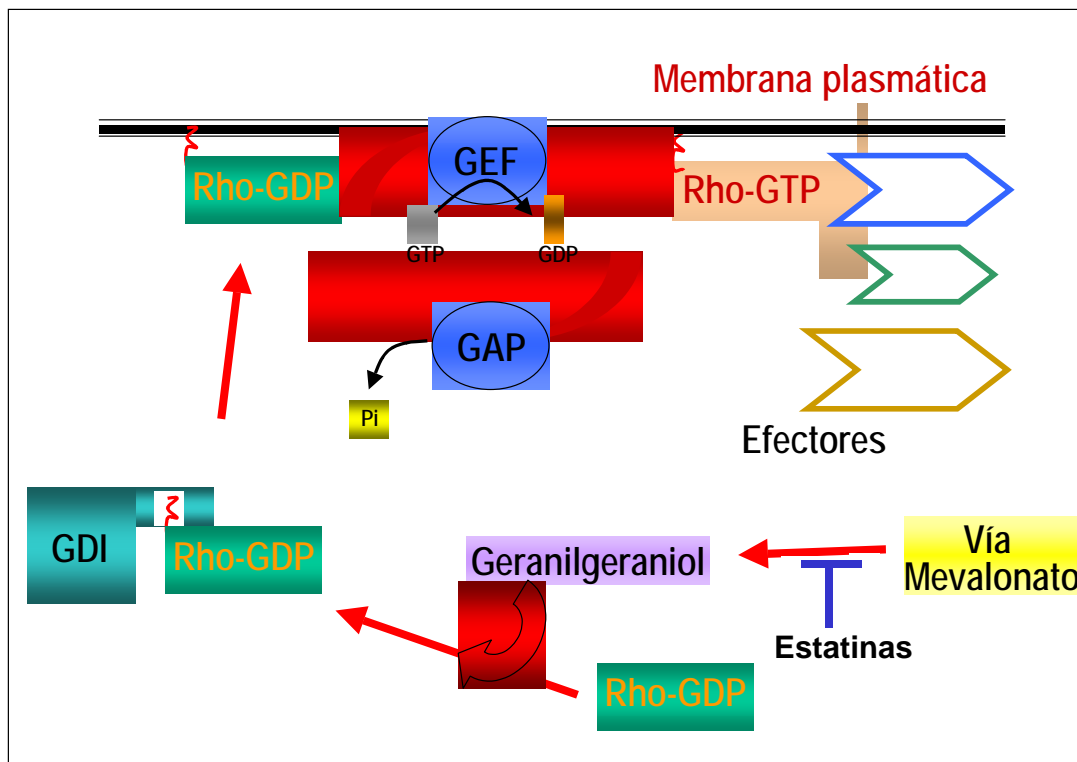


Fig. 9 . Actividad de las proteínas Rho. La activación de las proteínas Rho, es un proceso regulado por tres clases de proteínas. En un estado inicial se encuentra inactivo en citoplasma unido a GDI que impide el intercambio de Guanina. GEF se activa y esto produce que Rho se pueda liberar de GDI, anclarse en membrana, e intercambiar GDP por GTP. Rho-GTP es activo y puede interactuar con sus diferentes efectores. GAP induce la actividad GTPasa intrínseca de Rho esto produce Rho-GDP que es inactivo.

2.2.2 Modificaciones lipídicas y localización subcelular.

Las proteínas Ras y Rho son modificadas postraduccionalmente con compuestos isoprenoides derivados de la vía del mevalonato (ver apartado 2.1), por enzimas denominadas preniltransferasas. Esta isoprenilación es necesaria para su anclaje en membrana (Allal C. et al. 2000) (ver figura 9). Existen dos tipos de preniltransferasas: la farnesiltransferasa y la geranilgeranioltransferasa. Estos enzimas catalizan la unión covalente de los grupos farnesilo y el geranilgeraniol respectivamente. La unión se realiza en el extremo C-terminal de las proteínas sobre una cisteína que se localiza en una secuencia denominada señal de isoprenilación CAAX (C es cisteína, A normalmente es un aminoácido alifático, y

X cualquier aminoácido). El enzima farnesiltransferasa reconoce secuencias CAAX donde X puede ser una serina, metionina, cisteína, alanina o glutamina, (caso de las proteínas de la familia Ras). Si X es una leucina o isoleucina, se suele tratar de una proteína de la familia Rho y entonces es geranylgeranilada por la geranyltransferasa. Posteriormente la proteína sufre dos modificaciones más: una endoproteólisis que libera los aminoácidos AAX, y una carboxi-metilación de la nueva isoprenilcisteína expuesta. Estas modificaciones postprenilación son necesarias para la correcta localización de proteínas de la familia Ras, pero no en el caso de las proteínas Rho (*Michaelson D. et al. 2005*).

Existen proteínas de la familia Rho que no son geranylgeraniladas, sino que como en el caso de RhoB pueden sufrir las dos modificaciones lipídicas o ser farnesiladas como en el caso de TC10 y RhoD (*Wennerberg K. et al. 2004*).

2.2.3 RhoA.

RhoA es el miembro prototipo de la subfamilia de proteínas que lleva su nombre. Esta subfamilia la integran tres isoformas: RhoA, RhoB y RhoC. Estas tres proteínas se encargan básicamente de la regulación del citoesqueleto y del ensamblaje de las fibras de estrés de actina. (*Wheeler AP. et al. 2004*). La secuencia de aminoácidos de RhoA, Rho B y Rho C es altamente homóloga (85% de identidad), y difieren principalmente en C-terminal.

RhoA y células musculares lisas

Un gran número de evidencias, han demostrado la importancia de RhoA en la fisiología vascular. En las CML, RhoA participa en la contracción, la diferenciación, y en la migración y proliferación celular. En la contracción de CML, RhoA es reconocida hoy en día como el principal regulador de la sensibilización al calcio de las proteínas contráctiles (*Pfizer G. 2001*). Esto le permite regular la contracción a través de una de sus proteínas diana la quinasa asociada a Rho (*Rho-associated kinase, ROCK/Rho kinase/ROK*) (ver apartado 2.2.4) que actúa sobre la fosforilación de la cadena ligera de la miosina (*myosin light chain, MLC*).

RhoA es una proteína crítica en el control de la diferenciación de las CML a través de la regulación de la transcripción dependiente del factor de respuesta a suero (*serum response factor*, SRF). La diferenciación de las CML está marcada por la expresión de proteínas del citoesqueleto y contráctiles. Esta expresión está coordinada por SRF (Miano JM. 2003), cuya localización celular es regulada por RhoA, que de este modo modifica la expresión de genes involucrados en la diferenciación celular (Liu HW. et al. 2003). Diferentes estudios han demostrado que una inhibición de RhoA produce una disminución de la expresión de genes de marcadores de la diferenciación de las CML (Loirand G. et al. 2005).

La inhibición directa de RhoA o de su efector ROCK inhibe la migración de las CML inducida por el PDGF, el ácido lisofosfatídico o la trombina. Este efecto se produce mediante mecanismos dependientes e independientes de la fosforilación de MLC (Ai S. et al. 2001; Seasholtz TM. et al. 1999). Además, también esta involucrada la fosforilación de proteínas asociadas a las adhesiones focales (Liu B. et al. 2002).

RhoA está involucrada en la proliferación de las CML inhibiendo proteínas que regulan el tránsito del ciclo celular como p27^{Kip1} y la p21^{cip1/waf1} (Seibold S et al. 2004; Hengst L. Reed SI. 1996; Lai JM. et al. 2002). Además, RhoA activa diferentes factores de transcripción como CREB y SRF (Han JS. et al. 2003; Lockman K. et al. 2004) y vías de señalización como la p38 MAPK (Han JS. et al. 2003), e induce la expresión de genes como *c-fos* y *c-jun* (Marinissen MJ. et al. 2004). La inhibición de la isoprenilación de las proteínas Rho y Ras por estatinas, inhibe la proliferación de las CML (ver apartado 2.3.2). Este proceso es revertido por el geranylgeraniol, pero no por el farnesol, lo que subraya la importancia que tienen las proteínas Rho en la proliferación celular.

2.2.4 RhoA y ROCK

La quinasa asociada a Rho (ROCK/*Rho-Kinase*/ROK) es una proteína efectora de RhoA a la cuál se une para realizar la mayoría de sus funciones biológicas. ROCK es una proteína quinasa de residuos Ser/Thr que presenta dos isoformas (ROK α /ROCK2 y ROK β /ROCK1) que se expresan diferencialmente en los tejidos.

RhoA unida a GTP interactúa con la región C-terminal de ROCK donde encontramos un dominio de unión a RhoA (RB). En esta misma zona pero más hacia el extremo C-terminal, encontramos un dominio con homología a la plecstrina (PH) que interactúa con la zona catalítica de la propia proteína, inhibiendo así la función transfosforilasa de ROCK. Cuando RhoA interactúa con el dominio RB de ROCK, produce un cambio conformacional que libera el dominio PH y activa la proteína. El principal sustrato de ROCK es la fosfatasa de la MLC. Este es un enzima que en estado activo desfosforila la MLC, de forma que inhibe la contracción celular. Cuando RhoA se une a ROCK, ésta se activa y puede fosforilar la fosfatasa de la MLC, que queda inactiva y no puede desfosforilar a la MLC. Cuando ROCK está activa también fosforila a MLC directamente aumentando así la respuesta contráctil (*Amano M. et al. 2000*). Mediante este mecanismo RhoA interviene en la formación de fibras de estrés y las adhesiones focales. Utilizando inhibidores de ROCK (como por ejemplo el Y-27632), se ha estudiado el papel de este enzima en diferentes vías de señalización. Así se ha descrito el papel crítico de ROCK en la síntesis de DNA y la estimulación de la migración en las CML (*Seasholtz TM. et al. 1999*). ROCK también participa en los procesos de activación celular regulados por RhoA (ver apartado 2.2.3).

El activador mejor conocido para ROCK es Rho, pero ROCK puede ser activada por otros medios. Por ejemplo, durante la apoptosis, la caspasa 3 es capaz de cortar el extremo C-terminal de ROCK, produciendo su activación y como resultado cambios en membrana y citoesqueleto (*Coleman ML. et al. 2001*).

2.3 Estatinas

Los inhibidores de la HMG-CoA reductasa (estatinas), han revolucionado el tratamiento de la hipercolesterolemia. Son los fármacos más eficientes y más utilizados para reducir los niveles de colesterol en plasma. Las estatinas fueron descritas por primera vez en 1971 por Endo y Kuroda. Estos autores detectaron la presencia de compuestos activos procedentes de *Penicillium citrinum* que inhibían la HMG-CoA reductasa. El primer compuesto identificado fue la mevastatina, (*Endo A. 2004*). En 1987 se aprobó en EEUU la comercialización

para uso humano de la lovastatina. Los estudios en modelos animales y los ensayos clínicos con estatinas (*Group 4S. 1994; LIPID, 1995; WOSCOPS 1992; AFCAPS, Downs JR. et al. 1998; PROVE-IT, Cannon CP. et al. 2002; MIRACL, Waters DD. et al. 2002; REVERSAL, Nissen SE. et al. 2004; ASCOT, Sever PS et al 2001; TNT, Waters DD. et al. 2004*), han puesto de manifiesto la estrecha relación de los niveles circulantes de LDL con la progresión de las lesiones ateroscleróticas y con el riesgo de muerte asociada a cardiopatía isquémica.

2.3.1 Efectos pleiotrópicos de las estatinas

Debido a la asociación entre niveles de colesterol y enfermedad coronaria, la reducción de los niveles de LDL por estos fármacos parece ser la principal causa de su beneficio clínico. Sin embargo, en los últimos años se han acumulado evidencias que sugieren que el éxito de las estatinas puede no deberse únicamente a la reducción de los niveles plasmáticos de LDL. Así el análisis de subgrupos de pacientes de algunos ensayos clínicos, como el CARE (*Sacks FM. et al. 1996*) y el WOSCOPS, sugiere que con niveles de LDL comparables, los pacientes tratados con la estatina presentan menor riesgo cardiovascular. Las estatinas inhiben la vía de síntesis del mevalonato (ver figura 8), en una de sus primeras reacciones (HMG-CoA reductasa), por lo que afectan no sólo a la biosíntesis del colesterol, sino también a la de otros compuestos funcionalmente importantes para la célula. En particular las estatinas reducen la disponibilidad celular de farnesilpírofosfato y geranilgeranilpírofosfato (ver apartado 2.1). La incorporación postransduccional de estos productos en las proteínas isopreniladas, es imprescindible para que estas se localicen en la membrana plasmática y participen en la transducción de señales y en la organización del citoesqueleto celular (ver apartado 2.2.2). Por este motivo son decisivos en la regulación de procesos vitales para la célula como el tráfico de macromoléculas a través de la membrana, el transporte intracelular, la migración y la proliferación celular. Uno de los ejemplos más claros del efecto pleiotrópico de las estatinas se observa en la síntesis de NO. En muchos estudios se ha observado que las estatinas aumentan la síntesis de NO mediante la regulación de la eNOS. En

presencia de estatinas, aumenta la vida media del mRNA de eNOS, y por tanto la síntesis de NO. Este efecto es revertido por el geranilgeraniol, lo que sugiere que intervienen proteínas geranilgeraniladas (*Martinez-Gonzalez J. et al. 2001*). Al inhibir Rho (proteína geranilgeranilada) o su efector ROCK, el resultado obtenido sobre eNOS es similar al de las estatinas. Esto implica, que a través de la inhibición de la prenilación de Rho, las estatinas producen un aumento de eNOS (*Laufs U, Liao JK. 1998*).

Ya sea debido exclusivamente a la reducción de los niveles de LDL o con la participación de los efectos pleiotrópicos, numerosos estudios indican que las estatinas mejoran la función endotelial, exhiben propiedades antiinflamatorias y antiproliferativas, y modulan el estrés oxidativo y la trombosis, efectos todos ellos que se traducen en la estabilización de las lesiones (*Martinez-Gonzalez J, Badimon L. 2003*).

Se ha observado también, que al interferir la isoprenilación de las proteínas de las familias Rho y Ras, las estatinas interrumpen las vías de transducción de señales a través de las cuales diferentes factores de crecimiento inducen la expresión de protooncogenes y promueven la proliferación de las CML vasculares como se describe en el apartado 2.2.3.

3. Receptores Nucleares

3.1 Introducción

Existen pequeñas moléculas lipofílicas como las hormonas esteroidales, hormonas tiroideas o la forma activa de la vitamina A (retinoides) y de la vitamina D, que juegan un papel muy importante en el crecimiento, desarrollo, metabolismo, reproducción y morfogénesis de muchos organismos y entre ellos los seres humanos. Estas moléculas realizan su función a través de receptores nucleares que actúan como factores de transcripción inducibles por unión a ligando. Es decir, el receptor nuclear se activa al unirse a su ligando y se produce la transcripción de los genes regulados por este.

Desde que se clonó el primer receptor nuclear hace ya más de dos décadas, estos no se han dejado de estudiar e investigar permitiendo averiguar nuevos conceptos de su estructura, funcionalidad y regulación (Aranda A. Pascual A. 2001). Gracias a este conocimiento hoy día sabemos que la respuesta transcripcional de los receptores nucleares no se regula solo por su unión al DNA, sino también por la presencia de co-reguladores (coactivadores y co-represores) que son cruciales para transmitir la señal hormonal a la maquinaria transcripcional. Cuando se clonaron los receptores para los glucocorticoides y los estrógenos, se observó que estos tenían una gran homología con el oncogen *v-erbA* permitiendo el descubrimiento del locus *c-erbA* como el receptor de las hormonas tiroideas. La comparación de estas secuencias con otras y la utilización de librerías de cDNA en busca de homologías, ha abierto la posibilidad de caracterizar más de 50 receptores en la última década, dando a conocer nuevas respuestas hormonales y definir el concepto de “endocrinología reversa”, en la cuál la caracterización del receptor precede al conocimiento de la función fisiológica del mismo (Aranda A. Pascual A. 2001). Para muchos de estos receptores caracterizados se desconoce actualmente su ligando, por lo que han pasado ha denominarse huérfanos. El primer receptor huérfano que se clonó fue

el receptor del retinoide X. Gracias a la “endocrinología reversa”, se encontró su ligando, el ácido-9-cis retinoico, y de esta forma se pudo entender mejor los procesos fisiológicos regulados por los retinoides. En los últimos años han sido encontrados muchos ligandos de estos receptores huérfanos, entre ellos hay moléculas como ácidos grasos, leucotrienos, derivados del colesterol y derivados de benzoatos,. Pero existen otros muchos receptores nucleares huérfanos a los cuales no se les ha podido encontrar ligando y se cree que algunos de ellos actuarían constitutivamente, o se activarían mediante una modificación covalente como la fosforilación. Los receptores nucleares huérfanos juegan un papel clave en el desarrollo y en la homeostasis, pero se ha observado también que se encuentran relacionados con diferentes enfermedades entre las que se encuentran aterosclerosis, cáncer, diabetes y desordenes lipídicos. La relación de estas enfermedades y los receptores nucleares huérfanos hace que se hayan dedicado muchos estudios a estos, concentrados en la búsqueda de nuevas drogas agonistas y antagonistas, para poder regular su actividad.

3.2 La superfamilia de los receptores nucleares.

Los receptores nucleares se engloban todos bajo una misma superfamilia que tienen un ancestro común. Según el análisis evolutivo existen 6 clases diferentes (*Laudet V. 1997*). Podemos ver una clasificación de algunos de los receptores nucleares más destacados, según su clase (ver tabla 1):

- Clase I: Es una subfamilia amplia y está formada por el receptor de hormonas tiroideas (TR), el receptor del ácido retinoico (RAR), el receptor de la vitamina D (VRD), el receptor activado por proliferadores peroxisomales (PPAR) y algunos receptores nucleares huérfanos entre otros.
- Clase II: Entre los miembros de esta subfamilia encontramos el receptor del retinoide X (RXR), que destaca porque se activa uniéndose al ácido-9-cis retinoico, pero sobretudo porque juega un papel importante en la señalización de los receptores nucleares ya que se une con otros receptores para formar heterodímeros.

Introducción

- Clase III: Podemos destacar dos miembros importantes de esta subfamilia el receptor de esteroides, y el receptor relacionado con estrógenos.
- Clase IV, V, VI: Encontramos receptores nucleares huérfanos entre los cuales NGFB-I, FTZ-1/SF-1 y GCNF.

Clase	Receptor	Sub	Descripción	Ligando	E.R.	M, H, D
Clase I	TR	α, β	Receptor de hormonas tiroideas	Hormonas tiroideas	Pal; DR-4; IP	H
	VRD		Receptor de vitamina D	Vitamina D3	DR-3; IP-9	H
	RAR	α, β, γ	Receptor de ácido retinoico	Ácido all-trans-retinoico	DR-2; DR-5	H
	PPAR	α, β, γ	Receptor activado por proliferadores peroxisomales	Eicosanoides; TZDs; 15dPGJ2; AGP	DR-1	H
	LXR	α, β	Receptor Hepático X	Oxisteroles	DR-4	H
Clase II	RXR	α, β, γ	Receptor de Retinoide X	Ácido 9-cis retinoico	Pal; DR-1	D,H
Clase III	GR		Receptor de glucocorticoides	Glucocorticoides	Pal	D
	ER	α, β	Receptor de estrógenos	Estradiol	Pal	D
	EER	α, β, γ	Receptor relacionado con estrógenos	Desconocido	Pal	D,M
Clase IV	NGFB-I	α, β, γ	Clon B inducido por por NGF	Desconocido	Pal; DR-5	M, D,H
Clase V	SF-1/FTZ-F1	α, β	Factor-1 esteroideogénico	Oxisteroles	Hemisite	M, D,H
Clase VI	GCNF		Factor nuclear de célula germinal	Desconocido	DR-0	D

Tabla 1 Clasificación de receptores nucleares: **Clasificación según Subfamilia de los receptores nucleares más destacados. Forma de unirse al DNA: M=Monómero, D=Homodímero, H=Heterodímero. Configuración del elemento de respuesta a hormonas (HRE): , DR=Repetición directa, Pal=Palindroma, IP=Palindroma Invertido. NGF=Factor de Crecimiento Nervioso, TZDs=Tiiazolidinedionas, 15dPGJ2= 15-Deoxy-12,14-Prostaglandina J2.**

Los receptores nucleares regulan la transcripción de los genes uniéndose a su promotor en unas secuencias determinadas denominadas elementos de respuesta a hormona (*hormone response element*). La mayoría de HRE están

formados por dos secuencias hexaméricas separadas por un número de pares de bases que oscila entre 0 y 5. Estos HRE pueden estar configurados como un palíndromo, palíndromos invertidos, o como repeticiones directas.

Los receptores nucleares se unen al DNA como dímeros en la mayoría de los casos. Pueden hacerlo como homodímeros, caso de los receptores de esteroides, o formando heterodímeros con el RXR (en la mayoría de los casos). Algunos receptores nucleares huérfanos son capaces de unirse al DNA de forma monomérica, realizando uniones adicionales con bases que se encuentran 5' a través de la región CTE.

3.3 Estructura de los receptores nucleares

Los receptores nucleares presentan una estructura modular con diferentes regiones autónomas. En un receptor nuclear tipo, estas regiones autónomas son las siguientes:

- **Región A/B:** Situada en el extremo N-terminal, es la región que presenta más variabilidad entre los diferentes receptores nucleares. La mayoría de las isoformas de un receptor nuclear dentro de una misma subfamilia, se deben a variaciones en esta región, producidas por empalme (*splicing*) diferencial, por la utilización de promotores diferentes o por lugares de inicio de traducción diferentes. Dentro de esta región encontramos un dominio denominado AF-1, el cuál tiene función de activación transcripcional y contribuye a la activación constitutiva del receptor nuclear independiente de ligando.
- **Dominio de unión a DNA (DBD) o región C:** Es el dominio más conservado entre los receptores nucleares y permite reconocer secuencias diana en el DNA y activar genes. El DBD contiene 9 residuos de cisteína junto a otros aminoácidos, presentes en toda la superfamilia de receptores nucleares y que son requeridos para unirse al DNA. Este dominio está constituido por dos dedos de cinc que ocupan de 60 a 70 aminoácidos entre los cuáles encontramos 4 de las cisteínas conservadas en cada uno de los dedos compartiendo entre ellas un ión de Zn^{2+} . Los aminoácidos requeridos para el reconocimiento de secuencias de DNA se encuentran en el primer dedo de

cinc y se denomina Caja P, mientras que en el otro dedo encontramos otra secuencia de aminoácidos denominada Caja D que se encarga de la dimerización del receptor nuclear. Los dos dedos de cinc se pliegan de forma conjunta para formar una estructura compacta constituida por dos hélices α dispuestas perpendicularmente una a la otra. La primera hélice se une al surco mayor del DNA estableciendo contactos con bases específicas. Finalmente dentro de esta región encontramos una zona denominada CTE situada en la extensión C-terminal del DBD. Es una región de 25 aminoácidos que forma una tercera hélice que se empaqueta con la hélice 1 y está involucrada en la unión a DNA.

- Región D o de bisagra: Se denomina de bisagra porque actúa de unión entre el LBD el DBD permitiendo giros entre las dos partes de la molécula. Es una zona que no está bien conservada entre los diferentes receptores nucleares. En esta región encontramos las señales de localización nuclear y se ha visto que la mutación de ciertos aminoácidos de este dominio, inhibe la interacción del receptor nuclear con los corepresores.
- Dominio de unión al ligando (LBD) o Región E/F: Este es un dominio multifuncional que además de encargarse de la unión a ligando, media en la homo- y la heterodimerización, en la interacción con proteínas de choque térmico, en la actividad transcripcional dependiente de ligando, y en algunos casos, en la represión transcripcional reversible de hormonas. El LBD contiene dos regiones conservadas, una denominada "signature motif" o Ti y otra región denominada AF-2, situada más a C-terminal de LBD y responsable de la activación transcripcional dependiente de ligando. El LBD está constituido por 12 hélices α dispuestas en tres capas antiparalelas a forma de *sandwich* de hélices. La capa central del *sandwich* está empaquetada a su vez por dos capas de hélices, formando una cavidad denominada bolsillo de unión a ligando, la cual básicamente es hidrofóbica y se localiza en la mitad inferior del LBD. Dicho bolsillo es el lugar donde se acomoda el ligando, observándose un cambio conformacional del receptor nuclear cuando se produce esta interacción. En el momento de la unión, la hélice doce que se proyectaba

externamente, cambia de conformación y se empaqueta hacia el interior permitiendo a la región AF-2 interactuar con diferentes cofactores. (figura 11).

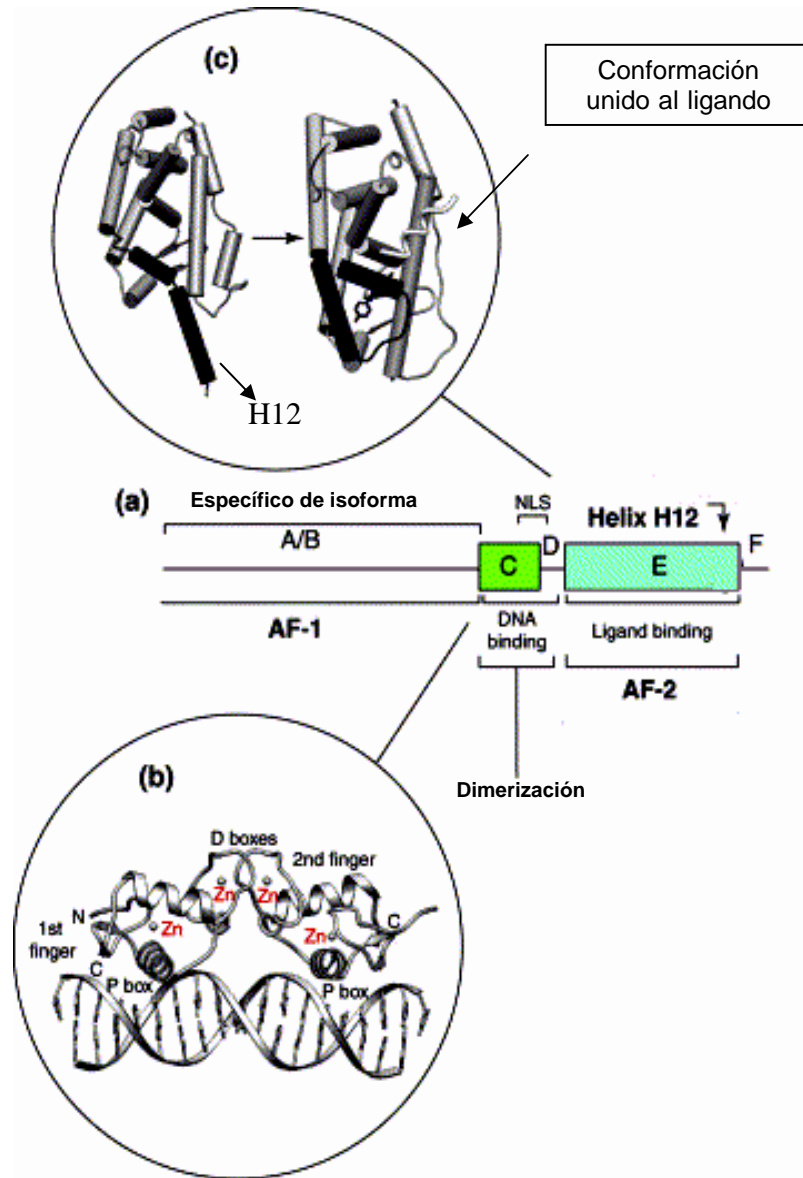


Figura 11: Estructura de un receptor nuclear: a) Estructura general de un receptor nuclear donde podemos observar las diferentes regiones A/B, C, D, E y F. Se presenta también la localización de los dominios AF-1 y AF-2, así como la secuencia NLS de localización nuclear. b) Esquema de los dedos de Cinc de los receptores nucleares. Disposición adoptada en el momento de la dimerización donde observamos la unión entre las dos cajas D, y la unión de las cajas P al surco mayor del DNA. c) Plegamiento de las 12 hélices α situadas en la región E de unión al ligando. Se muestra el cambio conformacional que sufre la hélice 12 al unirse el ligando al receptor nuclear. Adaptado de Altucci L. et al. 2001.

3.4 Regulación de la expresión génica por receptores nucleares.

Los promotores de los genes transcritos por la RNA polimerasa II (RNA pol II) son reconocidos por dos tipos de factores de transcripción: los factores de transcripción basal (FTB) que interactúan con elementos del núcleo del promotor y con la RNA pol II, y factores de transcripción específicos de secuencia, entre los cuales están los receptores nucleares. Estos regulan la actividad de los FTB regulando así la transcripción génica. Los receptores nucleares interactúan con los FTB mediante diferentes moléculas conocidas con el nombre de cofactores, coactivadores y corepresores ejerciendo así su función de factores de transcripción.

3.4.1 Coactivadores

Los coactivadores son los responsables de unir los receptores nucleares con los cofactores y la maquinaria basal de transcripción. Los coactivadores pueden interactuar de diferentes maneras con los receptores nucleares, pero principalmente lo hacen a través de AF-1 y AF-2. Los coactivadores pueden unirse al dominio AF-1 de manera independiente de ligando, aunque este proceso puede estar regulado por diferentes mecanismos como puede ser fosforilación. La interacción al dominio AF-2 depende de la unión de ligando. Al unirse el ligando se produce un cambio de conformación del LBD y los cofactores pueden irse al dominio AF-2. Aunque este sea el paradigma clásico de la activación de los receptores nucleares, existen grandes excepciones que se explican más abajo.

Se han encontrado diferentes familias de coactivadores. El primer coactivador que se encontró fue SCR-1 (*Onate SA. et al. 1995*), el cual pertenecía a la familia p160. Este coactivador interactúa con los receptores nucleares de manera dependiente de ligando del dominio AF-2, aunque también se ha observado que interactúa con el dominio AF-1 (*Alen P. et al. 1999; Ma H. et al. 1999; Onate SA. et al. 1998*). Los cofactores de esta familia activarían la transcripción a través de diferentes mecanismos, por ejemplo pueden interactuar con el cofactor CBP y además tienen la actividad intrínseca histona acetil transferasa (HAT).

No todos los coactivadores son proteínas, se han identificado un RNA que también actuaría como un coactivador (*Lanz RB. et al. 1999*). Este RNA se denomina SAR y actuaría a través de un complejo nucleoriboproteico que interaccionaría con el dominio AF-1.

3.4.2 Cofactores

Los cofactores son proteínas que unen los factores de transcripción dependiente de secuencia y sus coactivadores con la maquinaria basal de transcripción. Un ejemplo de cofactor ampliamente estudiado son las proteínas de unión a CREB (*CREB binding protein, CBP*) y su parólogo p300. Se ha visto que estas proteínas interaccionan con diferentes factores de transcripción y coactivadores de la familia de p160 (*Kamei Y. et al. 1996*). Pero además de la función de proteína de anclaje, CBP/p300 tienen actividad histona acetiltransferasa, con la cual pueden acetilar histonas, disminuir la represión mediada por cromatina y de esta manera facilitar la transcripción. Otra histona acetiltransferasa implicada en la transactivación de los receptores nucleares es la proteína PCAF, que puede interaccionar con los receptores nucleares (*Blanco JC. et al. 1998*), y también con miembros de la familia de p160 (*Korzus E. et al. 1998*).

Otro complejo proteico que puede actuar como cofactor es el complejo TRAP/DRIP, también conocido como un mediador. Está formado por unas 14 o 16 proteínas y puede interaccionar con los receptores nucleares a través de los dominios AF-2 de manera dependiente de ligando. El complejo TRAP/DRIP podría interaccionar con diferentes proteínas, entre las cuales hay que destacar la subunidad grande de la RNA pol II. De esta forma recluta la polimerasa para activar la transcripción del gen diana.

3.4.3 Corepresores

Existen diferentes receptores nucleares que en ausencia de su ligando actúan como un represor de la transcripción (*Graupner G. et al. 1989*). Se cree que este fenómeno se debe a que están asociados a diferentes proteínas llamadas corepresores. Los dos primeros corepresores que se encontraron son los que se

conocen mejor su mecanismo de acción, están estructuralmente relacionados y son el corepresor nuclear (NcoR) (Horlein AJ. et al 1995), y el mediador silenciador para receptores de retinoico y de hormona tiroidal (SMRT) (Chen JD. et al. 1995). En condiciones en las cuales no hay ligando, los corepresores están fuertemente unidos al receptor nuclear impidiendo que se pueda activar la transcripción. Una vez unido al ligando, y gracias al cambio conformacional que se produce, el corepresor pierde afinidad por el receptor nuclear y se libera.

3.4.4 Interacción de los receptores nucleares con las otras vías de transducción de señales.

Inicialmente los efectos de los receptores nucleares sobre la expresión génica se atribuyeron al hecho de que pueden unirse al DNA y de esta forma regulan la actividad de los promotores de los cuales son diana. Hoy en día se sabe a parte del mecanismo anterior, que existe la modulación de diferentes vías de transducción de señales. Los primeros datos vinieron al descubrir mecanismos moleculares de la acción antiinflamatoria y antiproliferativa de los glucocorticoides y los glucretinoides. Se observó que estos receptores nucleares inhibían la actividad del factor de transcripción AP-1 (Yang-Yen HF. et al. 1990; Schule R. et al. 1990). Posteriormente se encontraron que también podían inhibir el efecto sobre NF- κ B (Hass R. et al. 1992) o sobre CREB (Chatterjee VK. et al. 1991). Los mecanismos moleculares implicados en este proceso pueden ser variados y dependen del estímulo y del tipo celular (Karin M, Chang L. 2001). Estos mecanismos pueden ser por competencia por los cofactores, por interacciones directas, o por la inhibición de diferentes proteínas quinasas. En cualquier caso el receptor nuclear tiene que estar unido a su ligando, pero en una conformación diferente a la que este adopta cuando se une al DNA.

Por tanto, los receptores nucleares pueden modular la expresión génica a diferentes niveles, mediante la unión a sus elementos de respuesta, o modulando la actividad de diferentes vías de transducción de señales. El hecho de que estén regulados por moléculas pequeñas e hidrofóbicas (en el caso de la mayoría de

ellos), hace que sea relativamente fácil sintetizar moléculas que modulen su actividad, y por tanto tener un amplio abanico de posibilidades farmacológicas.

3.5 NOR-1

El gen receptor nuclear huérfano derivado de neuronas 1 (*neuron-derived nuclear orphan receptor-1*, NOR-1/MINOR/NR4A3), fue identificado y clonado por primera vez en neuronas en cultivo (*Ohkura N. et al. 1994*) y en linfocitos T activados (*Hedvat CV. et al. 1995*). Pertenece a la familia NGFI-B (NR4A) a la cual también pertenecen los receptores nucleares Nur77/NGFI-B/NR4A1 y Nurr1/NR4A2. Estos tres receptores son huérfanos y tienen una alta homología en su dominio DBD y moderada en el LBD. La familia NR4A está involucrada en diferentes funciones: NOR-1 es clave en el desarrollo embrionario (*DeYoung RA. et al. 2003*), Nurr1 para el desarrollo de las neuronas dopaminérgicas (*Zetterstrom RH. et al. 1997*), NOR-1 y Nur77, juegan un papel importante en la apoptosis de timocitos en la selección positiva (*Cheng LE. et al. 1997; Woronicz JD. et al. 1994*), además se ha visto que estos dos receptores participan de la proliferación de diferentes tipos celulares, (*Ponnio T. et al. 2002; Kolluri SA. et al. 2003*) y que NOR-1 juega un papel clave en la modulación de la proliferación y migración de células musculares lisas y que se sobreexpresa en lesiones arteriales humanas (*Martinez-Gonzalez J. et al. 2003*). Los genes de esta familia son de respuesta rápida frente diferentes factores de crecimiento (*Martinez-Gonzalez J, Badimon L. 2005*), siendo su actividad regulable por la cantidad de proteína disponible, pero también por otros mecanismos.

3.5.1 Unión al DNA.

Los miembros de la familia NGFI-B pueden unirse al DNA de diferentes formas. Primeramente se observó que se unían de forma monomérica al elemento de respuesta a NGFI-B (*NGFI-B response element, NBRE*) (*Wilson TE. et al. 1991*). Éste está formado por 8 bases que son la secuencia hexamérica típica de los receptores nucleares precedidas de dos adeninas. En este caso, para establecer la unión de la proteína al DNA, se requiere, además de la presencia de la caja P,

residuos de la región CTE. Más adelante se encontró que miembros de la familia NGFI-B pueden unirse al DNA formando homodímeros y heterodímeros entre ellos, en los elementos de respuesta a Nur77 (Nur77 response element, NURE). (*Philips A. et al. 1997, Maira M. et al. 1999*). Estos elementos están compuestos por dos repeticiones invertidas de la secuencia NBRE, separadas por 6 nucleotidos. Además tanto Nur77 como Nurr1, pueden unirse a DR5 heterodimerizando con RXR (*Zetterström RH. et al. 1996*).

3.5.2 Estructura génica y proteica de NOR-1

En el genoma humano, el gen que codifica para NOR-1 está situado en el cromosoma 9q22, está constituido por 8 exones, con una estructura exones-intrones parecida a la que tienen otros receptores nucleares (*Ohkura N. et al. 1996*). Parece ser que podría haber diferentes isoformas de NOR-1 producidas por *splicing* diferencial (*Ohkura N. et al. 1998*) (Figura 12). NOR-1 β se diferencia de NOR-1 α por tener el exón 3 más largo (exón 3B), pero este hecho no afectaría en la secuencia de la proteína. Las otras dos diferencias vendrían causadas por variantes producidas en el exón 5. Al usar el exón 5B, se produciría una proteína truncada debido a que aparece una señal de parada de la traducción en la secuencia del mensajero. Esto produciría una proteína sin LBD. En el caso de NOR-1 esta proteína no se ha encontrado, aún que si se ha identificado su cDNA correspondiente en una librería de cDNA de músculo esquelético (*Labelle Y. et al. 1995*). En el caso de Nurr1, la correspondiente proteína parólogo actúa como dominante negativo, posiblemente porque se puede unir al DNA, pero al no tener LBD no puede transactivar (*Ohkura N. et al. 1999*).

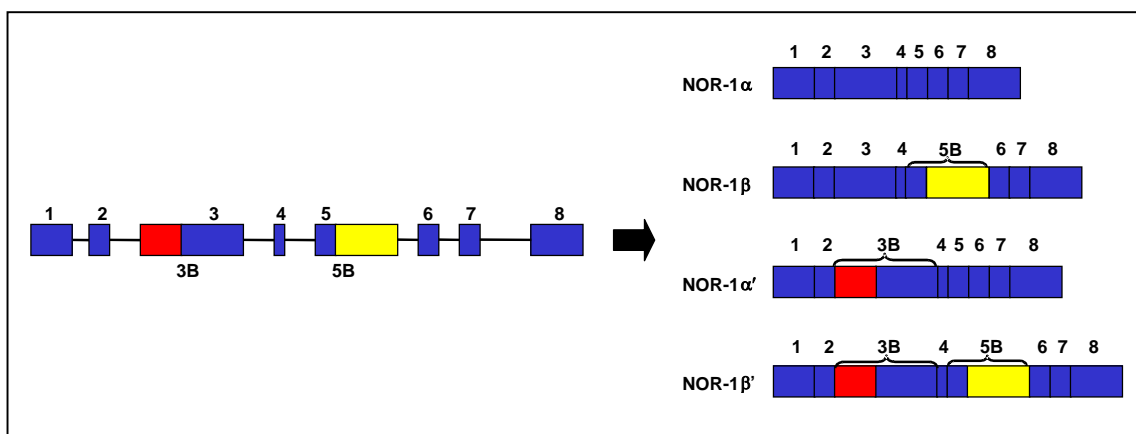


Figura 12 .Esquema de los diferentes transcritos que se pueden generar a partir del gen de NOR-1 por splicing diferencial. Se pueden generar hasta cuatro isoformas diferentes.

Como ya se ha comentado, en la mayoría de los receptores nucleares el dominio AF-2, presente en el LBD, es clave para la unión de diferentes coactivadores. Parece ser que en el caso de NOR-1 y Nur77 no se sigue este paradigma. Sorprendentemente tanto en el caso de NOR-1 (*Wansa KD. et al. 2003*) como en el caso de Nur77 (*Wansa KD. et al. 2002*). El LBD interactúa de forma débil con diferentes cofactores. Parece ser que la activación con cofactores, en especial de la familia p160, se produce a través del dominio AF-1 situado en el extremo NH₂-terminal. Este dominio también puede reclutar otros coactivadores como CBP o elementos del complejo DRIP/TRAF. Además la unión de p160 a AF-1 promueve una unión intramolecular con el LBD, posiblemente para estabilizar el complejo receptor-coactivadores.

La divergencia en el mecanismo de regulación con otros receptores nucleares, parece ser causada por un cambio en la topología del dominio AF-2 de estas proteínas. En estudios de modelaje molecular de NOR-1 (*Wansa KD. et al. 2003*), y de Nur77 (*Wansa KD. et al. 2002*), así como en el análisis cristalográfico con rayos X del ortólogo de la familia en *Drosophila*, GHR 38 (*Baker KD. et al. 2003*), se ha visto que la topología del LBD no permite una correcta interacción con los cofactores. A diferencia de lo que pasa en la mayoría de los receptores nucleares donde existe un surco hidrofóbico en el dominio AF-2 necesario para la interacción con los coactivadores, en la familia NR4A existen diferentes residuos hidrofílicos que rompen la continuidad del surco. Además parece que GHR38 tiene

un bolsillo de unión al ligando bastante peculiar y parece ser que poco funcional. El espacio de este bolsillo está ocupado por cadenas laterales de 4 fenilalaninas que prácticamente ocupan todo el espacio dejando tan solo un espacio de 30 \AA^3 , el cual es insuficiente para permitir la unión de una molécula orgánica. Por tanto, parece ser que no hay espacio suficiente para que se pueda unir un hipotético ligando. El estudio cristalográfico de Nurr-1 también muestra la imposibilidad de unión de cofactores al dominio AF-2 o a un ligando (*Wang Z. et al. 2003*), sin embargo su LBD presenta una alta actividad transcripcional mediante un mecanismo no clásico.

Además en los receptores nucleares existe un residuo de arginina conservado cuya función es ayudar al anclaje del ligando, pero en el caso de esta familia, se conserva el residuo, pero está orientado hacia el solvente. Todos estos datos sugieren que ni el receptor GHR 38 ni Nurr1, tienen ligando, por lo menos ninguno que siga el modelo estándar de los receptores nucleares. El hecho que estos receptores tengan una homología significativa con NOR-1 en el LBD, y en concreto estén conservadas las 4 histidinas que ocupan el bolsillo de unión al ligando, junto con el hecho de que el LBD de NOR-1 no pueda unirse a los cofactores clásicos de los receptores nucleares, hace hipotetizar que NOR-1 tampoco tiene ligando.

4. Mecanismos de transducción de señales.

Las células responden a las alteraciones del ambiente o a señales provenientes de otras células, mediante diferentes mecanismos entre los que destaca los cambios de la expresión génica. Este mecanismo está regulado por vías de transducción de señales, que integran un estímulo extracelular o intracelular, y activan/reprimen a los factores de transcripción que regulan la actividad génica.

4.1 Proteínas G heterotriméricas

A través de receptores que existen en membrana, las células son capaces de recibir señales externas. Estos receptores están asociados a alguna actividad que les permita transmitir la señal al interior celular. La actividad puede ser enzimática (como los receptores tirosina-quinasa), puede ser a través de canales iónicos, o mediante la activación de proteínas G. Los receptores con esta propiedad se denominan receptores acoplados a proteínas G (*G protein coupled receptors*, GPCRs). Estos receptores están caracterizados por poseer 7 dominios transmembrana, y una amplia gama de ligandos entre los que podemos destacar la S1P, el LPA y la trombina. Cuando los ligandos se unen a sus receptores se activan una serie de proteínas G que inducen diferentes vías de señalización.

Las proteínas G están constituidas por tres subunidades α , β y γ , aunque funcionalmente hablamos de dos: $G\alpha$ y $G\beta\gamma$. Cuando los GPCRs son activados por su ligando, se produce un intercambio del GDP presente en subunidad $G\alpha$ por GTP, esto conlleva un cambio conformacional de la proteína, promoviendo la disociación de las dos subunidades funcionales. Cada una de estas dos subunidades activará diferentes efectores.

Existen cuatro familias de subunidades $G\alpha$:

G_s : Proteínas que activan la adenilato ciclasa (AC) enzima responsable de la producción del adenosin-3'-5'-monofosfato cíclico (cAMP). También puede modular la actividad de diferentes canales iónicos.

G_i : Modulan diferentes canales iónicos y fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos, e inhiben la actividad de la AC. La toxina bacteriana pertúsica inhibe a las proteínas de esta familia, exceptuando G_{α_z} .

G_q : Activan la fosfolipasa C_{β} (PLC_{β}), que hidroliza el fosfatidil inositol-4-5-bifosfato (PIP_2), generando dos mensajeros secundarios, inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG). El IP_3 promueve un aumento de los niveles citosólicos de calcio a través de la abertura de canales de calcio del retículo endoplasmático, y el DAG activa diferentes proteínas quinasas C (PKC).

G_{12} : Regulan la actividad de proteínas G pequeñas.

La subunidad $G_{\beta\gamma}$ también puede activar diferentes vías de señalización. Existen alrededor de 6 subunidades β y 12 de γ que se combinan para abarcar un amplio número de efectores. De esta forma se ha visto que modulan la actividad de diferentes PLC_{β} , de la AC, de proteínas tirosina-quinasa citosólicas como la Src, y de diferentes quinasas dependientes de fosfoinositol-3-fosfato (PI3K).

4.2 Proteínas quinasas

Catalizan la adición de un grupo fosfato procedente de ATP a otra molécula. Pueden actuar sobre glúcidos, lípidos o proteínas. Si actúan sobre proteínas podemos distinguir dos tipos de proteínas quinasas: serin-treoninas quinasas que fosforilan residuos serinas o treoninas (como la PKA o la PKC), y tirosina-quininas que actúan sobre residuos tirosina (como el receptor de VEGF).

4.2.1 Proteína quinasa A (PKA)

La PKA es dependiente de cAMP. En condiciones basales la proteína está inactiva formando un tetrámero constituido por dos subunidades: una reguladora (subunidad R), y otra catalítica (subunidad C) (*Walsh DA. et al. 1968*). Cuando aumentan los niveles de cAMP, este se une a la subunidad R, provoca un cambio conformacional en la proteína, que produce una disociación de las subunidades C y R, quedando PKA catalíticamente activa (*Kopperud R. et al. 2003*).

Además de este mecanismo, también se ha observado que la subunidad C puede estar inactiva unida a NF- κ B-I κ B. Cuando I κ B se degrada, se activa el complejo, la subunidad C queda libre, y PKA se activa (Zhong H. et al. 1997).

4.2.2 Proteína quinasa C (PKC)

PKC es una familia de serin-treonina quinasas reguladas por diferentes estímulos y que se pueden clasificar en 4 grupos según estructura primaria y mecanismos de regulación.

PKC convencionales (cPKC): Formado por PKC α , PKC β I y β II, y PKC γ . Para activarse necesitan unirse a DAG, calcio y fosfatidilserina (PS).

PKC nuevas (nPKC): Está formado por PKC δ , PKC ϵ , PKC η , y PKC θ . También necesitan unirse a DAG y PS pero no a calcio.

PKC atípicas (aPKC) Está formado por PKC ξ y PKC λ . Para su activación no necesitan ni DAG ni calcio, pero si PS.

PKC μ : También conocida como PKD. Igual que las aPKC no se regula ni por calcio ni por DAG, pero si por PS.

Las PKC para activarse deben de ser fosforiladas en el dominio catalítico. Una de las posibles PKC quinasas podría ser la proteína quinasa dependiente de fosfoinositol-1 (phosphoinositoid-dependent kinase-1, PDK-1) (Chou MM. et al. 1998, Dutil EM. et al. 1998). Las diferentes PKC pueden fosforilar proteínas involucradas en múltiples procesos celulares como la proliferación y la migración. Esto sucede en el caso de las MAPK.

4.3 Vía de las MAPK

Las MAPK son una familia de serin-treonina quinasas que regulan diversos procesos celulares claves como son la proliferación, la migración o la apoptosis (Pearson G. et al. 2001). Generalmente, las MAPK necesitan ser fosforiladas en un residuo de treonina y otro de tirosina, separadas por un residuo variable (TXY), para ser activadas. La activación de las MAPK se produce por una cascada de fosforilación consecutiva en la que interviene como mínimo dos quinasas más. Las MAPK quinasas (MKK) son unas quinasas que tiene un dominio serin-treonina

quinasa y otro dominio tirosina quinasa, de forma que puede activar a las MAPK. Las MKK son activadas por fosforilación por las MKK quininas (MKKK). Este conjunto de tres quininas forman módulos independientes que responden a diferentes estímulos.

Las MKKK pueden estar reguladas por otras quininas (MKKKK) o proteínas G pequeñas como Ras y Rho. Las diferentes quininas de la vía pueden ser desactivadas por diversas fosfatasas de residuos serin-treonina o tirosina, o incluso una fosfatasa dual que puede desfosforilar ambos residuos en las MAPK.

Entre los diferentes módulos de las MAPK, sobretodo en el paso de MKK-MAPK, existen múltiples puntos de entrecruzamientos entre vías, aumentando la complejidad del sistema.

Las MAPK se dividen en diferentes familias:

Quinasas reguladas por estímulos extracelulares (*extracellular-stimulus regulated quininas*, **ERK**): Familia formada por dos miembros ERK-1/p44MAPK y ERK-2/p42MAPK. Son activadas por diferentes factores de crecimiento y señales mitogénicas. Juegan un papel clave en el ciclo celular fosforilando y activando diferentes factores de crecimiento como el SRF.

N-terminal Jun quinasa/proteínas quininas activadas por estrés (*jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinases*, **JNK/SAPK**). Formada por tres proteínas JNK1, JNK2 y JNK3. Son activadas por diferentes citoquinas algunas ligadas a GPCRs y por diferentes señales de estrés como sustancias que interfieren en la síntesis de DNA y proteínas.

P38 MAPK: Está compuesta por 4 genes que pueden presentar diferentes proteínas. Son activadas por diferentes citoquinas ligadas a GPCRs y por diferentes señales de estrés como el estrés térmico u osmótico.

4.4 CREB

La proteína de unión a los elementos de respuesta a cAMP (*cAMP response element binding protein*, CREB) es un factor de transcripción que puede ser activado por diferentes estímulos (Mayr B, Montminy M. 2001). Entre estos estímulos, además del cAMP, destacan diferentes factores de crecimiento, el

aumento de calcio citosólico y señales procedentes de integrinas o la luz ultravioleta. CREB forma parte de una familia de factores de transcripción a la cual también pertenecen CREM, ATF-1 y ATF-2. Estas proteínas tienen una estructura parecida compuesta por un dominio central denominado dominio inducible por quinasas (*kinases inducible domain*, KID), el cual tiene un residuo de serina susceptible de ser fosforilado por diferentes proteínas quinasas. Flanqueando este dominio nos encontramos dos dominios hidrofóbicos ricos en glutamina denominados Q1 y Q2. Finalmente en el dominio C-terminal, nos encontramos un dominio básico con cremallera de leucina (bZIP) el cuál es responsable de la unión al DNA y de la dimerización.

Estas proteínas se pueden unir al DNA como monómeros o dímeros en unas secuencias denominadas elementos de respuesta a cAMP (*cAMP response element*, CRE) (Montminy MR. et al 1986; Comb M. et al 1986; Short JM. et al. 1986). CRE está constituido por una secuencia polindrómica octamérica donde en principio CREB se une como dímero, aunque también se ha visto en numerosos promotores solo la mitad del palíndromo, siendo también funcional, aunque menos potente.

CREB está de forma constitutiva unido al DNA ya que la concentración de CREB nuclear es mayor que la constante de disociación a su elemento de respuesta (Hagiwara M. et al. 1993) y además su fosforilación no altera su afinidad por el DNA. La actividad de CREB se regula por fosforilación en la serina 133 (Gonzalez GA y Montminy M. 1989) situada en el dominio KID. La primera proteína quinasa que se vio que podía fosforilar CREB fue la PKA. Actualmente se sabe que puede ser fosforilada por diferentes quinasas como proteínas quinasas dependientes de calcio/calmodulina II/IV (*calcium calmodulin dependent kinases* II/IV, CaMK II/IV), p38 MAPK o la *rsk* entre otras.

Una vez CREB se fosforila en Ser¹³³, se produce un cambio conformacional que le permite unirse al cofactor CBP (Chrivia JC. et al. 1993). CBP, como ya se ha explicado anteriormente, es un cofactor que puede activar la transcripción a diferentes niveles ya que puede servir de proteína de anclaje para la maquinaria basal de transcripción y además posee una actividad histona acetiltransferasa

(HAT). En el caso concreto de CREB, la acetilación de las histonas supone un aumento del tiempo en que CREB está fosforilado (*Michael LF. et al. 2000*). También se ha observado que CBP puede acetilar directamente CREB produciendo un aumento en la actividad transcripcional de CREB (*Lu Q. et al. 2003*).

Aunque de forma general parece que la acetilación de histonas favorece la transcripción (*Kornberg RD. Y Lorch Y. 1999*), recientemente se ha observado en levaduras (*Bernenstein BE. et al 2000*) y en células de mamífero (*Rasclé A. et al 2003, Xu M. et al 2003*) que para que se produzca la expresión de algunos genes es necesaria la actividad histona deacetilasa (HDAC). En el caso de genes regulados por CREB esto dependería de cada promotor, pero en el caso de genes como NOR-1 y ICER, se ha observado que inhibidores de la actividad HDAC disminuirían la transcripción dependiente de CREB (*Fass DM. et al. 2003*).

CREB es un factor de transcripción involucrado en numerosos procesos celulares. En la actualidad se conocen más de 100 genes regulados por CREB. La mayoría de ellos pertenecen a genes involucrados en el metabolismo energético, pero CREB también regula la expresión de genes implicados en otros procesos celulares como la proliferación y la apoptosis (*Della Fazia MA. et al. 1997; Dragunow M. 2004*).

Por tanto CREB puede representar un punto de convergencia de diferentes vías de transducción de señales permitiendo la expresión de determinados genes según la necesidad de la célula.

*II. Hipótesis
y
Objetivos*

Hipótesis y Objetivos

Las LDL juegan un papel muy importante en el inicio y progresión de la enfermedad aterosclerótica, ya que entre otros efectos, inducen disfunción endotelial y promueven la activación de las CML. Los mecanismos moleculares a través de los cuales las LDL activan estos procesos, sólo se conocen en parte.

NOR-1 es un receptor nuclear huérfano, que ha sido indentificado recientemente en nuestro laboratorio como un factor de transcripción clave en la activación por suero de las CML.

Teniendo en cuenta estos antecedentes formulamos la siguiente hipótesis: “NOR-1 está implicado en la activación de las células vasculares inducidas por factores crecimiento y LDL, y puede ser modulado por fármacos que inhiben el desarrollo de la lesión aterosclerótica”. Para comprobar esta hipótesis se plantearon los siguientes objetivos.

- **Analizar el papel de NOR-1 en la proliferación de las CML inducida por LDL.**
- **Analizar si NOR-1 está implicado en la inhibición por estatinas de la proliferación de las CML inducida por LDL y determinar el mecanismo.**
- **Analizar el papel de NOR-1 en la proliferación de las CE inducida por mitógenos (VEGF).**

III. Resultados

Involvement of Neuron-Derived Orphan Receptor-1 (NOR-1) in LDL-Induced Mitogenic Stimulus in Vascular Smooth Muscle Cells: Role of CREB

Jordi Rius, José Martínez-González, Javier Crespo, Lina Badimon

Objective—Low density lipoproteins (LDLs) modulate the expression of key genes involved in atherogenesis. Recently, we have shown that the transcription factor neuron-derived orphan receptor-1 (NOR-1) is involved in vascular smooth muscle cell (VSMC) proliferation. Our aim was to analyze whether NOR-1 is involved in LDL-induced mitogenic effects in VSMC.

Methods and Results—LDL induced NOR-1 expression in a time- and dose-dependent manner. Antisense oligonucleotides against NOR-1 inhibit DNA synthesis induced by LDL in VSMCs as efficiently as antisense against the protooncogene *c-fos*. The upregulation of NOR-1 mRNA levels by LDL involves pertussis-sensitive G protein-coupled receptors, Ca²⁺ mobilization, protein kinases A (PKA) and C (PKC) activation, and mitogen-activated protein kinase pathways (MAPK) (p44/p42 and p38). LDL promotes cAMP response element binding protein (CREB) activation (phosphorylation in Ser¹³³). In transfection assays a dominant-negative of CREB inhibits NOR-1 promoter activity, while mutation of specific (cAMP response element) CRE sites in the NOR-1 promoter abolishes LDL-induced NOR-1 promoter activity.

Conclusions—In VSMCs, LDL-induced mitogenesis involves NOR-1 upregulation through a CREB-dependent mechanism. CREB could play a role in the modulation by LDL of key genes (containing CRE sites) involved in atherogenesis. (*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:697-702.)

Key Words: atherosclerosis ■ lipoproteins ■ smooth muscle cells ■ gene expression ■ proliferation

Vascular smooth muscle cell (VSMC) migration and proliferation play key roles in the pathophysiology of vascular remodeling associated with atherosclerotic diseases.^{1,2} Because low density lipoproteins (LDLs) are key factors in the onset and development of atherosclerosis, their effects on VSMCs have been investigated.²⁻⁵ Indeed, LDLs induce VSMC mitogenesis,⁶⁻¹¹ increase intracellular free calcium concentration,^{7,9,11} activate mitogen-activated protein kinases (MAPK),⁹⁻¹¹ and regulate the expression and activity of different transcription factors, including *c-fos*, *egr-1*, and sterol regulatory element binding protein-2 (SREBP-2).^{9,12-15}

Recently, we have identified, by mRNA-differential display (mRNA-DD) analysis, neuron-derived orphan receptor-1 (NOR-1) as an early-response gene in VSMCs.¹⁶ NOR-1, together with Nur77 and Nurr1, forms the growth factor-induced protein-B (NGFI-B) family of orphan nuclear receptors within the steroid/thyroid receptor superfamily.¹⁷ These genes have been involved in neuroendocrine regulation, neural differentiation, liver regeneration, cell apoptosis, and mitogenic stimuli in different cell types.¹⁸ NOR-1 is upregulated by coronary angioplasty, and both NOR-1 and Nur77 are overexpressed in atherosclerotic lesions from patients with coronary artery disease (CAD).^{16,19}

In the present study, we show that NOR-1 expression is transiently induced by LDL and is linked to LDL-induced VSMC mitogenic effects. NOR-1 induction by LDL involved pertussis-sensitive G protein-coupled receptors, Ca²⁺ mobilization, the activation of different protein kinases [protein kinases A (PKA) and C (PKC) and MAPK (p44/p42 and p38)], and cAMP response element binding protein (CREB) activation. Finally, analysis of NOR-1 promoter activity revealed a key role of cAMP response elements (CRE) in the upregulation of NOR-1 by LDL. These results suggest that NOR-1 may play a key role in the molecular mechanisms underlying VSMC activation by LDL.

Methods

Lipoprotein Isolation

Human LDLs and very low density lipoproteins (VLDLs) were isolated from pooled sera of healthy blood donors of the Barcelona area as described.²⁰ The content of protein (BCA protein assay, Pierce) and cholesterol (Cholesterol assay kit, RefLab) in the lipoproteins was determined by colorimetric assays. The absence of contamination by other lipoproteins was determined by electrophoresis on agarose gels (Paragon Electrophoresis kit, Beckman Lipoproteins). Lipoproteins were endotoxin-free, as determined by the Limulus Amebocyte Lysate pyrogen testing system (BioWhittaker

Received December 10, 2003; accepted January 2, 2004.

From the Centro de Investigación Cardiovascular, CSIC/ICCC, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

Correspondence to Prof Lina Badimon, Laboratorio de Investigación Cardiovascular, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Sant Antoni Maria Claret # 167, 08025 Barcelona (Spain). E-mail lbmucv@cid.csic.es

© 2004 American Heart Association, Inc.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. is available at <http://www.atvbaha.org>

DOI: 10.1161/01.ATV.0000121570.00515.dc

Inc.), and they did not contain any detectable levels of thiobarbituric-acid-reactive substances (TBARS). Oxidized LDL (oxLDL) was prepared by exposing native LDL to 10 $\mu\text{mol/L}$ CuSO_4 at 37°C for 6 hours as described.²⁰ The TBARS content of oxLDL was ≈ 40 nmol malonaldehyde/mg LDL protein.

VSMC Cultures

VSMCs were obtained from human nonatherosclerotic arteries of hearts removed in transplant operations by using a modification of the explant technique,²¹ and those used in the experiments were between the third and fifth passage. Briefly, VSMCs were cultured in M199 supplemented with 20% FCS, and 2% human serum, 2 mmol/L L-glutamine, and antibiotics (100 U/mL penicillin and 0.1 mg/mL streptomycin). Cell culture media and reagents were from GIBCO/BRL (Invitrogen). Cells were seeded in multiwell plates, and were arrested at subconfluency with medium containing 0.4% FCS for 48 hours. Arrested cells were stimulated with increasing concentrations of LDL for different times. When inhibitors were used, VSMCs were preincubated with them for 30 minutes before stimulus (unless otherwise stated). The inhibitors used were pertussis toxin (Sigma) (added 16 hours prior to cell stimulation), H-89 (a PKA inhibitor, Sigma), 1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethano-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid tetrakis acetoxymethyl ester (BAPTA-AM, a calcium chelator, Sigma), bisindolylmaleimide I (GF-109203X, a PKC inhibitor, Sigma), PD98059 (an ERK kinase (MEK) inhibitor, Sigma), or SB203580 (a p38 MAPK inhibitor, Oxford Biomedical Research Inc.).

The inhibitors did not produce any effect on cell morphology, cell apoptosis (assessed by staining with Hoesch 33258 colorant), or cell viability as analyzed by measuring the mitochondrial dehydrogenase activity with a commercial kit (XTT based assay for cell viability, Roche).

In transfection experiments, we used rat VSMCs obtained by using the explant technique.²¹ Rat VSMCs were cultured in DMEM supplemented with 10% FCS and antibiotics (100 U/mL penicillin and 0.1 mg/mL streptomycin).

Northern Blot

Total RNA was isolated using Ultraspec (Biotex) according to the manufacturer's recommendations. RNA samples were fractionated in 1.2% agarose gels containing formaldehyde, transferred by capillary to nylon membranes (Nytran plus, Schleicher & Shuell), and UV cross-linked. Filters were prehybridized and hybridized as described.²⁰ NOR-1 cDNA labeled with [α -³²P]dATP (3000 Ci/mmol, Amersham) was used as a probe. Filters were exposed to Agfa Curix RP2 X-ray films at -80°C .

RT-PCR

Total RNA from VSMCs was isolated as indicated above, was reverse-transcribed, and NOR-1 mRNA levels were analyzed by polymerase chain reaction (PCR) using the PCR DIG Labeling Mix (Roche Molecular Biochemicals) as described.¹⁶ The specific NOR-1 oligonucleotides used were for human, 5'-AGGGC-TGCAAGGGCTTTTCAAGAGA-3' and 5'-TGCTTTCTA-CAGGAGCTGCT-3', and for rat, 5'-AGGGCTGCAAGGGCT-TCTTCAAGA GA-3' and 5'-TGCTTTCTATGGGAGCTGCT-3'. Amplification was carried out by 24 cycles: denaturation at 94°C for 30 seconds; annealing, 61°C for 1 minute; and polymerization, 72°C for 1 minute 30 seconds. PCR products were resolved by electrophoresis in agarose gels and transferred onto nylon membranes (Nytran plus, Schleicher & Shuell) by a standard capillary technique. Blots were UV cross-linked. Detection of digoxigenin-labeled nucleic acids was performed with an antidigoxigenin antibody linked to alkaline phosphatase, and CSPD was used as substrate. Levels of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) were used to normalize results.¹⁶

Determination of DNA Synthesis

Arrested human coronary smooth muscle cells (SMCs) were stimulated with LDL (30 mg protein/dL) in medium containing 0.5

$\mu\text{Ci/mL}$ of [³H]thymidine in presence or absence of phosphorothioate oligodeoxynucleotides (ODNs) against NOR-1 or *c-fos* (used as control), and [³H]thymidine incorporation was determined as described.^{16,21} The antisense ODN against NOR-1 (5'-TTGGA-CGCAGGGCAT-3') and against *c-fos* (5'-GCCCGAGAACATCAT-3') have been previously used to assess the involvement of these genes in cell proliferation.^{16,22} The effect of a mismatched (5'-TCTTCTAATGTCAGG-3') and a random phosphorothioate ODN (5'-TAGCTTGATGTGAGG-3') on DNA synthesis was also assessed.

Western Blot

Human VSMCs were cultured and stimulated with lipoproteins as indicated. Cell monolayers were washed with PBS and lysed with lysis buffer (1% SDS in 10 mmol/L Tris-HCl [pH 7.4], 1 mmol/L ortovanadate). Proteins were analyzed by Western blot as described.²⁰ Blots were incubated with an antibody against CREB phosphorylated in Ser¹³³ (Sigma) or against total CREB (Santa Cruz Biotechnology). Detection was performed using a horseradish peroxidase-labeled anti-rabbit IgG and the Supersignal detection system (Pierce). Equal loading of protein in each lane was verified by staining filters with Ponceau.

Electrophoretic Mobility Shift Assay

Nuclear extracts (3 μg) from VSMCs and a double-stranded probe corresponding to the sequence of human NOR-1 promoter (from -84 to -41 ; Nor/3CRE) containing three putative CRE motifs were used in an electrophoretic mobility shift assay (EMSA) as described.¹⁶ Supershift experiments were performed with antibodies against CREB, ATF-2, c-FOS, and c-JUN (Santa Cruz Biotechnology).

Construction of NOR-1 Promoter Plasmids

The plasmid pNOR α -1703 containing the human NOR-1 promoter (from -1703 to $+264$)²³ was kindly provided by Dr N. Ohkura (Growth Factor Division, National Cancer Center Research Institute, Tokyo, Japan). CRE motifs were mutated by site-directed mutagenesis on the construct pNOR α -1703: mtCRE1 was mutated using the QuikChange Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene) and the oligonucleotide 5'-GGGAGGAGGAGGGTgcatcAGCGTCCC-ATGGCGTCACATTGACG-3';¹⁶ mtCRE2 and mtCRE3 (kindly provided by Dr H. Tokumitsu, Department of Chemistry, Kagawa Medical University, Kagawa, Japan) used the oligonucleotide 5'-AGCGTCCCATGGCcgatcATTGACGTCTCG-3' and 5'-CATGGCGTCACATgctGTCTCGATTCCA-3' respectively, as described.²⁴

Transient Transfection and Luciferase Assays

Rat VSMCs were transfected with luciferase expression vectors (wild pNOR α -1703 or with constructs mutated in single CRE boxes) using Lipofectamine Reagent (Invitrogen) and Plus Reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. Transfected cells were arrested for 48 hours and were then stimulated with LDL for 4 hours. Luciferase activity was measured in cell lysates using Luciferase assay Kit (Promega). pSV β -gal (Promega) was used as an internal control. In cotransfection assays a CREB dominant-negative (Clontech) was used.

Statistical Analysis

Results are expressed as mean \pm SEM. A Stat View II (Abacus Concepts) statistical package for the Macintosh computer system was used for all analysis. Multiple groups were compared by using one-factor ANOVA, followed by Fisher PLSD to assess specific group differences.

Results

LDL Induces NOR-1 Expression in VSMC

To assess the effect of native LDL on NOR-1 expression in VSMC, arrested cells were stimulated with increasing con-

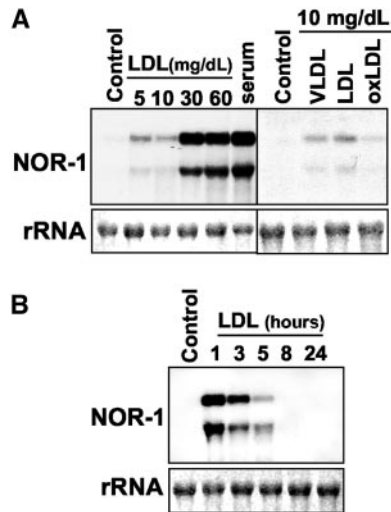


Figure 1. LDL induced NOR-1 expression in human VSMCs. A, Northern blot showing NOR-1 expression in human coronary SMC exposed to increasing concentrations of LDL and serum (10%), and to 10 mg protein/dL of VLDL, LDL, or oxLDL. B, VSMCs were stimulated with LDL (30 mg/dL) at different times. Control: noninduced cells. Blots are representative of three independent experiments. rRNA indicates ribosomal RNA.

centrations of LDL, and NOR-1 mRNA levels were analyzed by Northern blot. LDL induced NOR-1 expression in a dose-dependent manner (Figure 1A). The effect produced on NOR-1 upregulation by the highest tested concentrations of VLDL and oxLDL (10 mg/dL) was lower than that of equivalent amount of native LDL. The effect of LDL (30 to 60 mg/dL) was similar to that of serum. NOR-1 expression was transiently induced by LDL following the same pattern as that of serum-induced cells,¹⁶ peaking at 1 hour and decreasing to undetectable levels 8 hours after stimulus (Figure 1B).

Antisense NOR-1 ODNs Inhibit LDL-Induced DNA Synthesis

NOR-1 upregulation by LDL was significantly reduced when human VSMCs were treated with antisense ODNs targeted against NOR-1 (AS-NOR-1), while the corresponding sense sequence (SE-NOR-1) did not produce any effect (Figure 2A). In these conditions LDL-induced VSMC DNA synthesis was significantly inhibited by AS-NOR-1 but not by SE-NOR-1 (Figure 2B). The effect of AS-NOR-1 was similar to that of antisense against *c-fos* (AS-FOS), a well-known gene involved in cell proliferation.^{21,22,25} Finally, neither mismatches AS-NOR-1 nor random ODNs inhibited DNA synthesis in human VSMCs stimulated with LDL.

Signaling Pathways Involved in NOR-1 Induction

LDLs activate different signal transduction pathways in VSMCs. To address which of these pathways were involved in NOR-1 induction, we used specific inhibitors of different pathways. Results shown in Figure 3A indicate that NOR-1 upregulation by LDL was dependent on the activation of $G_{i/o}$ -proteins (inhibited by pertussis toxin), calcium mobilization [inhibited by a calcium chelator (BAPTA-AM)], and PKC activation (inhibited by GF-109203X, a PKC inhibitor).

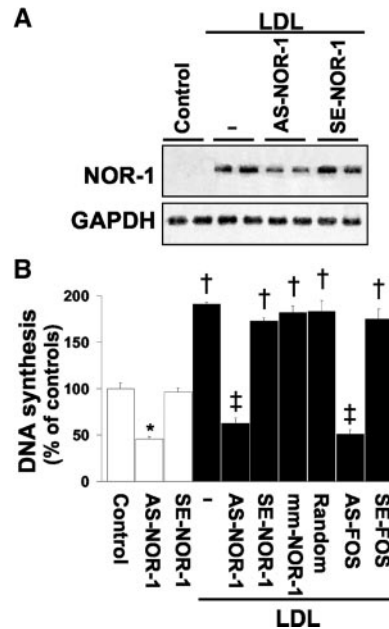


Figure 2. NOR-1 antisense inhibited LDL-induced VSMC DNA synthesis. A, Arrested human VSMCs were preincubated for 6 hours with antisense oligodeoxynucleotides (10 μ mol/L) against NOR-1 (AS-NOR-1) or sense (SE-NOR-1), and NOR-1 mRNA levels were analyzed by RT-PCR after LDL stimulus (30 mg/dL). B, DNA synthesis in human VSMCs treated with AS-NOR-1 (10 μ mol/L) or anti-*c-Fos* (AS-FOS) after LDL stimulus. Sense (SE-NOR-1 and SE-FOS), mismatches AS-NOR-1 (mm-NOR-1), and random oligodeoxynucleotides were used as controls. The black bars indicate LDL-treated cells, and the white bars indicate untreated cells. Results represent the mean \pm SEM (n=3 independent experiments performed in triplicate). $P < 0.05$: *, versus LDL untreated cells (Control or treated with SE-NOR-1); †, versus LDL untreated cells; ‡, versus cells treated with LDL alone or with LDL plus ODNs other than AS-NOR-1 or AS-FOS.

NOR-1 induction by LDL was also dependent on p44/p42 MAPK (inhibited by PD98059) and p38 MAPK activation (inhibited by SB203580) (Figure 3B). Finally, H-89 (a PKA inhibitor) also inhibited the LDL effect.

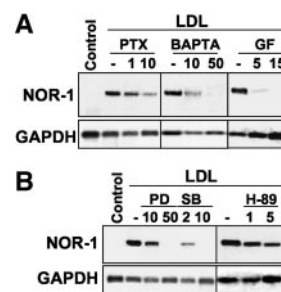


Figure 3. Signaling pathways involved in NOR-1 induction. VSMCs were pretreated with different signal pathway inhibitors, stimulated with LDL (30 mg/dL) for 1 hour, and NOR-1 mRNA levels were analyzed by using RT-PCR. A, Effect of pertussis toxin (PTX, 1 or 10 ng/mL), BAPTA-AM (10 or 50 μ mol/L), or GF-109203X (GF, 5 or 15 μ mol/L) on LDL-induced NOR-1 mRNA levels. B, Effect of PD98059 (PD, 10 or 50 μ mol/L), SB203580 (SB, 2 or 10 μ mol/L), or of H-89 (1 or 5 μ mol/L) on LDL-induced NOR-1 mRNA levels. Control: non-induced cells. Representative blots (n=3) are shown.

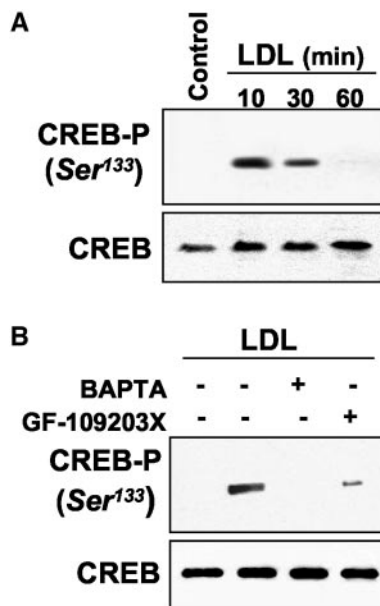


Figure 4. CREB activation by LDL in VSMC. A, Western blot showing CREB activation (phosphorylation in Ser¹³³) induced by LDL (30 mg/dL) at different times. B, Western blot showing the preventive effect of BAPTA-AM (BAPTA, 50 μ mol/L) or GF-109203X (GF, 15 μ mol/L) on CREB activation produced by LDL treatment (for 10 minutes). Representative blots (n=3) are shown.

LDL Induces CREB Phosphorylation

Because CREB activation is a common output of the signal transduction pathways involved in NOR-1 upregulation,²⁶ we analyzed the effect of LDL on CREB activation (phosphorylation in Ser¹³³). Figure 4 shows that LDL induced early activation of CREB that was prevented by either BAPTA-AM or GF-109203X, two compounds that reduced LDL-induced NOR-1 expression. Thus, CREB could play a major role in NOR-1 upregulation by LDL.

CREB Binds the CRE Sites Present in the NOR-1 Promoter

In gel shift assays, nuclear extracts from human VSMCs bind to a probe (Nor/3CRE) containing the three putative CRE sites present in NOR-1 promoter (from -83 to -42)²³ (Figure I, available online at <http://atvb.ahajournals.org>). Although LDL induced CREB phosphorylation, no changes in CREB binding were observed, in accordance with the ability of CREB to constitutively bind to its response element.²⁶ The binding was specific (completed by an excess of cold-probe) and was supershifted by an antibody against CREB but not by anti-ATF-2, anti-c-Fos or anti-c-Jun antibodies.

CRE Sites Regulate NOR-1 Induction by LDL

In order to analyze the role of CRE sites in LDL-induced NOR-1 expression we transfected rat VSMCs. As in human VSMCs, LDLs in rat cells induced NOR-1 expression and both a calcium chelator (BAPTA-AM) and a PKC inhibitor (GF-109203X) prevented this effect (Figure II, available online at <http://atvb.ahajournals.org>). In transfection assays, LDLs induced NOR-1 promoter activity (\approx 4-fold over un-

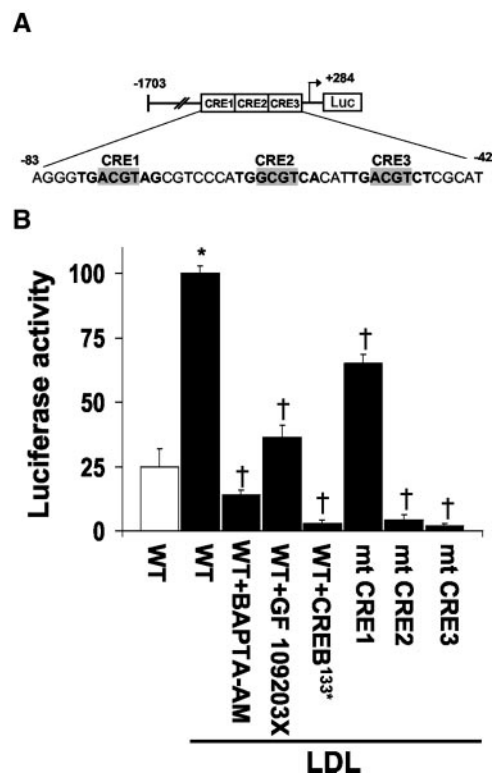


Figure 5. CRE motifs regulate NOR-1 induction by LDL. A, Structure of the NOR-1 promoter; the three CRE motifs present in positions from -83 to -42 are shown. CRE sites are indicated in bold, and the bases mutated are boxed. B, LDL increased NOR-1 promoter activity in cells transfected with the wild-type promoter (pNOR α -1703); this effect was prevented by either BAPTA-AM or GF-109203X. NOR-1 promoter activity was also prevented by either cotransfection with a dominant negative of CREB (CREB^{133*}) or by mutation on CRE sites (mtCRE1, mtCRE2, or mtCRE3). The black bars indicate LDL-treated cells, and the white bars indicate untreated cells. Results represent the mean \pm SEM (n=3 independent experiments performed in triplicate). $P < 0.05$: *, versus LDL untreated cells; †, versus cells transfected with only wild-type promoter and treated with LDL alone.

stimulated cells), while either BAPTA-AM or GF-109203X inhibited such effect (Figure 5B).

The activity of the wild-type NOR-1 promoter was prevented by cotransfection with a dominant-negative of CREB (CREB^{133*}). Finally, by site-directed mutagenesis we showed that when the CRE1 site was mutated, NOR-1 promoter activity decreased up to 35%, while the mutation of either CRE2 or CRE3 almost abolished NOR-1 promoter activity.

Discussion

Hypercholesterolemia is one of the most important risk factors in atherogenesis. LDL induces changes in vascular gene expression, leading to alterations in vascular function and promoting growth-related events;⁶⁻¹³ however, the transcription factors involved in LDL mitogenic effects have not been completely elucidated. In the present study, we show that LDL upregulates NOR-1, an orphan receptor involved in VSMC proliferation¹⁶ through a complex mechanism involving multiple signaling pathways and CREB activation.

NOR-1 is a member of the NGFI-B family of orphan nuclear receptors.^{17,18} These genes are involved in neuroen-

doctrine regulation, neural differentiation, liver regeneration, cell apoptosis, and mitogenic stimuli in different cell types.¹⁸ NOR-1 is essential for proliferation of the semicircular canals of the inner ear as has been recently demonstrated in NOR-1 knockout mice;²⁷ NOR-1 also modulates VSMC response to injury *in vitro* and is induced by coronary angioplasty *in vivo*,¹⁶ a condition that promotes VSMC proliferation.²⁵ Here, we show that LDLs induce NOR-1 expression in VSMCs through a complex network of signal transduction pathways, including pertussis-sensitive G proteins, Ca²⁺ mobilization, and the activation of PKA, PKC, and MAPK (p44/p42 and p38), pathways commonly activated in cell migration and proliferation.^{28,29} The inhibition of one of these apparently redundant pathways, in particular PKC and calcium mobilization, completely prevents NOR-1 upregulation promoted by LDL, in accordance with the major role of these pathways in native LDL-induced vascular cell proliferation.^{7,30}

We previously showed that growth factors such as platelet-derived growth factor (PDGF) or epidermal growth factor (EGF) are poor inducers of NOR-1, while serum is a strong inducer of NOR-1, acting through a complex web of signaling pathways.¹⁶ By nature LDLs are highly complex molecules different from growth factors such as PDGF, which promotes early gene induction and cell growth acting through its canonical PDGF receptor. Indeed, LDLs regulate gene transcription through mechanisms depending on their classical receptor (LDL-R)^{14,15} and on other uncharacterized receptors including G protein-coupled receptors.¹¹ In fact, the “mitogenic” properties of LDLs seem to be related to their dual capability to induce early cell cycle events and to provide cholesterol that cells need to resume mitosis.^{8–10,31} The cross-talk between pathways could explain the diversity of second messengers and protein kinases involved in the upregulation of NOR-1 by LDL. Although all these pathways can potentially lead to CREB phosphorylation,²⁶ their specific contribution could vary depending on different factors, including cell type. In any case, antisense ODN against NOR-1 inhibited LDL-induced mitogenic effect induced by LDL in VSMCs as efficiently as an antisense ODN against the protooncogene *c-fos*, a well known gene involved in VSMC proliferation.^{21,22,25} Therefore, NOR-1 could play a key role integrating signaling pathways involved in LDL-triggered VSMC induction.

Recent work from independent groups has demonstrated the induction of members of the NGFI-B gene family in vascular cells.^{19,32,33} Nur77 is induced in rat VSMCs under apoptotic stimulus,³² and its overexpression prevents vascular lesion formation in a mouse model of vascular injury.¹⁹ Although NOR-1, Nur77, and Nurr1 are coexpressed in many tissues, they exhibit dissimilar abilities to bind to DNA response elements, which could lead to important functional differences. Indeed, Nur77 and Nurr1, but not NOR-1, can form heterodimers with the retinoid X receptor (RXR),³⁴ enabling it to activate transcription of vascular genes in a ligand-dependent manner via the retinoic acid response elements, and interestingly, RXR ligands exert antiproliferative effects on VSMCs.³⁵ Finally, although NOR-1, Nur77, and Nurr1 are closely related orphan receptors, their induction patterns in VSMCs are not coincident; in this regard, condi-

tioned medium from macrophages exposed to oxLDL strongly induce Nur77 in VSMCs, but had minor effect on NOR-1 expression.¹⁹

Because the pathways induced by LDL in our study shared CREB as a common output,^{26,28,36} we analyzed the role of CRE motifs present in NOR-1 promoter in the induction of NOR-1 by LDL. We show, for the first time, the LDL early induction of CREB phosphorylation in Ser¹³³, a key residue for CREB activity.^{26,37} By EMSA, we show that CREB binds to the CRE sites close to the transcription initiation point of NOR-1.²³ LDLs did not change basal CREB binding, in accordance with the ability of CREB to constitutively bind to its response element;²⁶ however, Ser¹³³ phosphorylation promotes CREB activation via recruitment of CREB-binding protein (CBP).^{26,37}

Transfection experiments indicate a key role for the CRE motifs present in the NOR-1 promoter for NOR-1 upregulation by LDL. Indeed, we show that cotransfection with a dominant negative of CREB (CREB with a single mutation in Ser¹³³), which binds to CRE sequences but cannot be activated,³⁷ prevented the induction of NOR-1 promoter activity by LDL. In addition, when CRE2 or CRE3 sites were mutated, the promoter activity fell down to basal levels, in accordance with previous results in nonvascular cells induced by the overexpression of a constitutive active form of calcium/calmodulin kinase kinase (CaM-KK).²⁴

Therefore, CREB activation seems to be key in LDL-induced NOR-1 upregulation. The activation of CREB by LDL could be relevant beyond NOR-1 upregulation because recent papers argue for a main role of this transcription factor in VSMC survival/proliferation and vascular remodeling processes,³⁸ and CRE sites seem to be key in cyclin A and D1 transcriptional regulation.^{39,40} In fact, we show that VLDLs, lipoproteins that also activate CREB and promote vascular cell proliferation,^{8,9,41} also upregulate NOR-1 expression. Finally, oxLDL, a well-known inducer of VSMC proliferation through a general induction of cell cycle proteins mainly involving reactive oxygen species and the transcription factor nuclear factor κ B (NF- κ B),^{42–44} had only a minor effect on NOR-1 upregulation.

In summary, circulating LDL levels could modulate vascular function through complex gene programs involving downstream genes regulated by CREB, among them NOR-1. Because NOR-1 expression is rapidly and highly induced in VSMCs exposed to stimuli such as LDL, NOR-1 could be regarded as a new target in both molecular and pharmacological approaches to modulate VSMC function.

Acknowledgments

This work was made possible by funds provided by FIS-99/0907 and FIS-PI020361 and the Freedom to Discover Program of Bristol-Myers Squibb Foundation (USA). We thank Dr N. Ohkura and Dr H. Tokumitsu for kindly providing the pNOR α -1703 promoter and the mtCRE2 and mtCRE3 constructs, respectively, and the Heart Transplant Team of the Division of Cardiology and Cardiac Surgery of the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau for their collaboration. We are indebted to the technical assistance provided by Olga Bell and Silvia Aguiló. Jordi Rius is a recipient of a Research Fellowship from Fundació de Investigació Cardiovascular-Catalana-Occidente and DURSI.

References

- Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999; 340:115–126.
- Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature.* 2000;407:233–241.
- Steinberg D, Wiztum JL. Lipoproteins and atherogenesis. *JAMA.* 1990; 264:3047–3052.
- Grundy SM. Role of low-density lipoproteins in atherogenesis and development of coronary heart disease. *Clin Chem.* 1995;41:139–146.
- Navab M, Fogelman AM, Berliner JA, Territo MC, Demer LL, Frank JS, Watson AD, Edwards PA, Lusis AJ. Pathogenesis of atherosclerosis. *Am J Cardiol.* 1995;76:18C–23C.
- Libby P, Miao P, Ordovas JM, Schaefer EJ. Lipoproteins increase growth of mitogen-stimulated arterial smooth muscle cells. *J Cell Physiol.* 1985; 124:1–8.
- Weisser B, Locher R, de Graaf J, Vetter W. Low density lipoprotein subfractions and $[Ca^{2+}]_i$ in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 1993;73:118–124.
- Björkerud S, Björkerud B. Lipoproteins are major primary mitogens and growth promoters for human arterial smooth muscle cells and lung fibroblasts in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1994;14:288–298.
- Sachinidis A, Kettenhofen R, Seewald S, Gouni-Berthold I, Schitz U, Seul C, Ko Y, Vetter H. Evidence that lipoproteins are carriers of bioactive factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:2412–2421.
- Locher R, Brandes R, Vetter W, Barton M. Native LDL induces proliferation of human vascular smooth muscle cells via redox-mediated activation of ERK 1/2 mitogen-activated protein kinases. *Hypertension.* 2002;39:645–650.
- Sachinidis A, Seewald S, Epping P, Seul C, Ko Y, Vetter H. The growth-promoting effect of low-density lipoprotein may be mediated by a pertussis toxin-sensitive mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Pharmacol.* 1997;52:389–397.
- Hahn AW, Ferracin F, Buhler FR, Pletscher A. Modulation of gene expression by high and low density lipoproteins in human vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991;178: 1465–1471.
- Sachinidis A, Ko Y, Wiczorek A, Weisser B, Locher R, Vetter W, Vetter H. Lipoproteins induce expression of the growth response gene-1 vascular smooth muscle cells from rat. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993;192: 794–799.
- Rodríguez C, Raposo B, Martínez-González J, Llorente-Cortés V, Vilahur G, Badimon L. Modulation of ERG25 expression by LDL in vascular cells. *Cardiovas Res.* 2003;58:178–185.
- Rodríguez C, Martínez-González J, Sánchez-Gómez S, Badimon L. LDL downregulate CYP51 in porcine vascular endothelial cells and in arterial wall through a sterol regulatory element binding protein-2-dependent mechanism. *Circ Res.* 2001;88:268–274.
- Martínez-González J, Rius J, Castelló A, Cases-Langhoff C, Badimon L. Neuron-derived orphan receptor-1 (NOR-1) modulates vascular muscle cell proliferation. *Circ Res.* 2003;92:96–103.
- Giguère V. Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocr Rev.* 1999;20:689–725.
- Maruyama K, Tsukada T, Ohkura N, Bando S, Hosono T, Yamaguchi K. The NGFI-B subfamily of the nuclear receptor superfamily. *Int J Oncol.* 1998;12:1237–1243.
- Arkenbout K, de Waard V, van Bragt M, van Achterberg T, Grimberg J, Pichon B, Pannekoek H, de Vries CJ. Protective function of transcription factor TR3 orphan receptor in atherosclerosis: decreased lesion formation in carotid artery ligation model in TR3 transgenic mice. *Circulation.* 2002;106:1530–1535.
- Martínez-González J, Raposo B, Rodríguez C, Badimon L. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibition prevents endothelial NO synthase downregulation by atherogenic levels of native LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:804–809.
- Martínez-González J, Viñals M, Vidal F, Llorente-Cortés V, Badimon L. Mevalonate deprivation impairs IGF-1/Insulin signalling in human vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis.* 1997;135:213–223.
- Leon Y, Vázquez E, Sanz C, Vega JA, Mato JM, Giraldez F, Represa J, Varela-Nieto I. Insulin-like growth factor-I regulates cell proliferation in the developing inner ear, activating glycosyl-phosphatidylinositol hydrolysis and Fos expression. *Endocrinology.* 1995;136:3494–3503.
- Ohkura N, Ito M, Tsukada T, Sasaki K, Yamaguchi K, Miki K. Alternative splicing generates isoforms of human neuron-derived orphan receptor-1 (NOR-1) mRNA. *Gene.* 1998;211:79–85.
- Inuzuka H, Tokumitsu H, Ohkura N, Kobayashi R. Transcriptional regulation of nuclear orphan receptor, NOR-1, by Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase cascade. *FEBS Lett.* 2002;522:88–92.
- Indolfi C, Esposito G, Di Lorenzo E, Rapacciuolo A, Feliciello A, Porcellini A, Avvedimento VE, Condorelli M, Chiariello M. Smooth muscle cell proliferation is proportional to the degree of balloon injury in a rat model of angioplasty. *Circulation.* 1995;92:1230–1235.
- Mayr B, Montminy M. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2:599–609.
- Ponnio T, Burton Q, Pereira FA, Wu DK, Conneely OM. The nuclear receptor Nor-1 is essential for proliferation of the semicircular canals of the mouse inner ear. *Mol Cell Biol.* 2002;22:935–945.
- Gutkind JS. The pathways connecting G protein-coupled receptors to the nucleus through divergent mitogen-activated protein kinase cascades. *J Biol Chem.* 1998;273:1839–1842.
- Garrington TP, Johnson GL. Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signalling pathways. *Curr Opin Cell Biol.* 1999; 11:211–218.
- Pintus G, Tadolini B, Posadino AM, Sanna B, Debidda M, Carru C, Deiana L, Ventura C. PKC/Raf/MEK/ERK signaling pathway modulates native-LDL induced E2F-1 gene expression and endothelial cell proliferation. *Cardiovasc Res.* 2003;59:934–944.
- Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature.* 1990;343:425–430.
- Watanabe T, Yoshizumi M, Akishita M, Eto M, Toba K, Hashimoto M, Nagano K, Liang Y-Q, Ohike Y, Iijima K, Sudoh N, Kim S, Nakaoka T, Yamashita N, Ako J, Ouchi Y. Induction of nuclear receptor NGFI-B gene and apoptosis in rat vascular smooth muscle cells treated with pyrrolidinedithiocarbamate. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21: 1738–1744.
- Liu D, Jia H, Holmes DI, Stannard A, Zachary I. Vascular endothelial growth factor-regulated gene expression in endothelial cells: KDR-mediated induction of Egr3 and the related nuclear receptors Nur77, Nur1, and Nor1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:2002–2007.
- Perlmann T, Jansson L. A novel pathway for vitamin A signaling mediated by RXR heterodimerization with NGFI-B and Nur1. *Genes Dev.* 1995;9:769–782.
- Wakino S, Kintsler U, Kim S, Jackson S, Yin F, Nagpal S, Chandraratna RA, Hsueh WA, Law RE. Retinoids inhibit proliferation of human coronary smooth muscle cells by modulating cell cycle regulators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:746–751.
- Xing J, Ginty DD, Greenberg ME. Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase. *Science.* 1996;273:959–963.
- Gonzalez GA, Montminy MR. Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell.* 1989;59: 675–680.
- Tokunou T, Shibata R, Kai H, Ichiki T, Morisaki T, Fukuyama K, Ono H, Iino N, Masuda S, Shimokawa H, Egashira K, Imaizumi T, Takeshita A. Apoptosis induced by inhibition of cyclic AMP response element-binding protein in vascular smooth muscle cells. *Circulation.* 2003;108: 1246–1252.
- Bottazzi ME, Buzzai M, Zhu X, Desdouets C, Brechot C, Associati RK. Distinct effects of mitogens and the actin cytoskeleton on CREB and pocket protein phosphorylation control the extent and timing of cyclin A promoter activity. *Mol Cell Biol.* 2001;21:7607–7616.
- Schneider G, Oswald F, Wahl C, Greten FR, Adler G, Schmid RM. Cyclosporine inhibits growth through the activating transcription factor/cAMP-responsive element-binding protein binding site in the cyclin D1 promoter. *J Biol Chem.* 2002;277:43599–43607.
- Norata GD, Pirillo A, Callegari E, Hamsten A, Catapano AL, Eriksson P. Gene expression and intracellular pathways involved in endothelial dysfunction induced by VLDL and oxidized VLDL. *Cardiovasc Res.* 2003; 59:169–180.
- Zettler ME, Prociuk MA, Austria JA, Massaeli H, Zhong G, Pierce GN. OxLDL stimulates cell proliferation through a general induction of cell cycle proteins. *Am J Physiol.* 2003;284:H644–H653.
- Watanabe T, Pakala R, Koba S, Katagiri T, Benedict CR. Lysophosphatidylcholine and reactive oxygen species mediate the synergistic effect of mildly oxidized LDL with serotonin on vascular smooth muscle cell proliferation. *Circulation.* 2001;103:1440–1445.
- Lin SL, Yen HT, Chen YH, Ku HH, Lin FV, Chen YL. Expression of interleukin-1 beta and interleukin-1 receptor antagonist in ox-LDL-treated human aortic smooth muscle cells and in neointima of cholesterol-fed endothelial-denuded rabbits. *J Cell Biochem.* 2003;88:836–847.

Adendum al artículo 1: *“Involvement of Neuron-derived Orphan Receptor-1 (NOR-1) in LDL-induced mitogenic stimulus in vascular smooth muscle cells: role of CREB”*.

Figura no publicada que complementa los resultados del artículo.

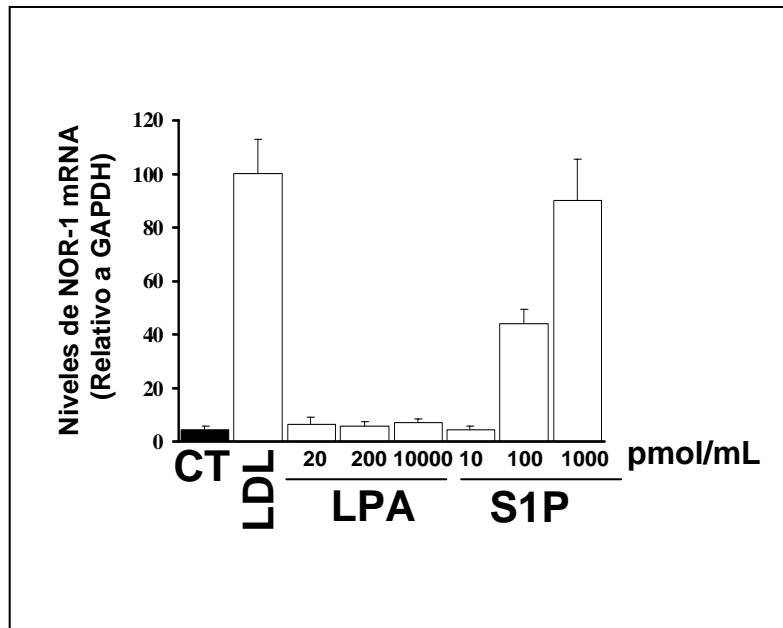


Figura 1 S1P induce expresión de NOR-1: Gráfica que muestra la expresión de NOR-1 en CML inducidas con diferentes concentraciones de S1P y LPA durante 1 hora. El RNA fue analizado por RT-PCR de tiempo real. Como se observa en la gráfica la S1P induce la expresión de NOR-1 a concentraciones altas, mientras que el LPA no produce efecto sobre la expresión de NOR-1.

Se quiso analizar el efecto de diferentes componentes de las LDL (la S1P y el LPA) sobre la expresión de NOR-1 en CML. Para ello, se sembraron CML en placa multipocillo con medio completo (20 % suero fetal bovino, 2% suero humano). Una vez las células estaban al 80% de confluencia, fueron incubadas con un medio pobre en suero (0,4% de suero fetal bovino). A las 48 horas, se indujeron con diferentes concentraciones de S1P y de LPA. Se obtuvo el RNA de estas células mediante Ultraspec® (Biotex Labs) siguiendo las indicaciones del fabricante. A partir de este RNA se obtuvo cDNA con el *kit TaqMan Reverse Transcription Reagents* de (Applied Biosystems) y se analizó por PCR en

tiempo real utilizando sondas para NOR-1 (Hs00175077_m1) y para GAPDH (4326317E) (Applied Biosystems). La S1P indujo la expresión de NOR-1 pero a concentraciones más altas, que las observadas en las LDL.



ELSEVIER

Cardiovascular Research xx (2005) xxx – xxx

*Cardiovascular
Research*

www.elsevier.com/locate/cardiore

1

2 Simvastatin inhibits NOR-1 expression induced by hyperlipemia by 3 interfering with CREB activation

4 Javier Crespo, José Martínez-González, Jordi Rius, Lina Badimon*

5 *Centro de Investigación Cardiovascular, CSIC/ICCC, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Sant Antoni Maria Claret # 167, 08025 Barcelona, Spain*

6 Received 19 January 2005; received in revised form 16 March 2005; accepted 21 March 2005

7

8

Time for primary review 25 days

9 Abstract

10 **Objective:** Our aim was to investigate whether neuron-derived orphan receptor-1 (NOR-1), an early gene induced by low density
11 lipoproteins (LDL) in vascular smooth muscle cells (VSMC), is regulated by statins.

12 **Methods:** NOR-1 expression was analyzed in human VSMC in culture and in vivo in the aorta of diet-induced hyperlipemic pigs by RT-
13 PCR and real-time PCR. [³H]Thymidine incorporation was used as an index of DNA synthesis. NOR-1 promoter activity was analyzed using
14 a luciferase reporter system. Cyclic AMP response element binding protein (CREB) binding was assessed by EMSA and ELISA and CREB
15 activation (phosphorylation in Ser¹³³) by Western blotting.

16 **Results:** Simvastatin inhibited NOR-1 expression induced by LDL in VSMC and by hypercholesterolemia in the abdominal aorta of
17 hyperlipemic pigs. The inhibition of the isoprenylation of geranylgeranylated proteins by simvastatin was key in both NOR-1 up-regulation
18 and DNA synthesis induced by LDL. Inhibitors of RhoA (toxin B and exotoxin C3) and ROCK (Y-27632) mimicked the effect of simvastatin
19 on NOR-1. Similarly both simvastatin treatment and cells transfected with a RhoA dominant-negative (RhoAT19N) showed inhibition of
20 LDL-induced NOR-1 promoter activity. These effects were associated to the interference of the activation of CREB, a key transcription factor
21 involved in NOR-1 induction. Finally, simvastatin prevented LDL induction of a reporter construct containing four consensus CRE and
22 inhibited the expression of SMemb (a marker for dedifferentiated VSMC) dependent on CREB.

23 **Conclusions:** NOR-1 is a target for simvastatin in the vascular wall. We identified NOR-1 and CREB as key transcription factors mediating
24 the effect of statins on VSMC proliferation through a mechanism dependent on RhoA/ROCK.

25 © 2005 European Society of Cardiology. Published by Elsevier B.V.

26

27 *Keywords:* Atherosclerosis; Gene expression; Lipoproteins; Smooth muscle cells; Statins

28

29 1. Introduction

30 Vascular smooth muscle cells (VSMC) migration and
31 proliferation play key roles in vascular remodeling asso-
32 ciated to atherosclerotic diseases [1]. Recently, neuron-
33 derived orphan receptor-1 (NOR-1) has been described as a
34 key early gene involved in VSMC proliferation [2,3]. NOR-
35 1 is up-regulated by coronary angioplasty [2] and is over-
36 expressed in atherosclerotic lesions from patients with
37 coronary artery disease (CAD) [2,4]. NOR-1 is induced by
38 growth factors and other key molecules involved in athero-

genesis such as low density lipoproteins (LDL) [2,3,5]. LDL 39
promote growth-related events, including up-regulation of 40
key transcription factors and DNA synthesis, in a LDL 41
receptor (LDL-R) independent manner [6–10]. 42

Statins are competitive inhibitors of 3-hydroxy-3-meth- 43
ylglutatharyl coenzyme A (HMG-CoA) reductase, the rate- 44
limiting step in cholesterol synthesis [11]. Statins have been 45
shown to be efficacious in reducing cardiovascular morbidity 46
and mortality in primary and secondary prevention 47
clinical trials [12,13]. The main pharmacological effect of 48
statins is the reduction of plasma LDL-cholesterol levels; 49
however, results from both clinical trials and from exper- 50
imental animal models [14–18] suggest that statins could 51
directly modulate vascular function. These pleiotropic 52

* Corresponding author. Tel.: +34 93 5565880; fax: +34 93 5565559.

E-mail address: lbadimon@csic-iccc.santpau.es (L. Badimon).

53 effects of statins seem to be a result of the ability of these
54 drugs to interfere posttranslational processing of isopreny-
55 lated proteins involved in cell signaling (i.e. Rho and Ras
56 proteins) and to regulate key genes controlling VSMC
57 function [15,16,19–22].

58 In the present study we show that statins prevent the up-
59 regulation of NOR-1 induced by LDL in vitro in human
60 VSMC and in vivo in the abdominal aorta of diet-induced
61 hyperlipemic pigs. Simvastatin inhibited LDL-induced
62 NOR-1 expression interfering RhoA/ROCK signaling and
63 cyclic AMP response element binding protein (CREB)
64 activation. Simvastatin could modulate other CREB-
65 dependent genes such as SMemb, a marker for dediffer-
66 entiated VSMC. Thus, both inactivation of CREB and
67 down-regulation of NOR-1 could be key events in switching
68 off downstream genes involved in VSMC cell growth.

69 2. Methods

70 2.1. VSMC cultures

71 VSMC were obtained by a modification of the explant
72 technique [19], from human non-atherosclerotic coronary
73 arteries of hearts removed in transplant operations. The study
74 was approved by the Reviewer Institutional Committee on
75 Human Research of the Hospital of Santa Creu i Sant Pau that
76 conforms to the Declaration of Helsinki. VSMC (from 3rd to
77 5th passages) were cultured in M199 (Gibco) supplemented
78 with 20% fetal calf serum (FCS), 2% human serum, 2 mmol/
79 L L-glutamine and antibiotics (100 U/mL penicillin and 0.1
80 mg/mL streptomycin). Cells were arrested in medium
81 containing 0.4% FCS for 48 h and then were stimulated with
82 LDL (30 mg protein/dL, for 1 h). Simvastatin (kindly
83 provided by MSD), atorvastatin (kindly provided by Pfizer),
84 mevalonate, geranylgeranyl and farnesol, were added 18 h
85 before treatment. When other inhibitors were used, VSMC
86 were pre-incubated with them for 30 min (unless otherwise
87 state), these inhibitors were: toxin B (Tox B, an inhibitor of
88 Rho proteins, Calbiochem), Y-27632 (a ROCK inhibitor;
89 Tocris Coukson Ltd.) and exotoxin C3 (a RhoA inhibitor;
90 Calbiochem), the pre-incubation time with this compound
91 was 24 h. The inhibitors did not produce any effect on cell
92 morphology, cell apoptosis (assessed by staining with
93 Hoesch 33258 colorant) or cell viability analyzed measuring
94 the mitochondrial dehydrogenase activity by a commercial
95 kit (XTT based assay for cell viability™; Roche). In
96 transfection experiments we used rat VSMC obtained by
97 the explant technique [19]. Rat VSMC were cultured in
98 DMEM supplemented with 10% FCS and antibiotics (100 U/
99 mL penicillin and 0.1 mg/mL streptomycin).

100 2.2. Animals

101 Female pigs (Landrace/Largewhite [Piensos Victoria SA,
102 Barcelona, Spain], mean body weight at initiation: 32±4 kg)

were randomized into two groups: normolipemic animals 103
(*n*=6) which were fed with a normal chow diet and 104
hyperlipemic animals (*n*=10) which were fed with a 105
cholesterol-rich diet (2% cholesterol; 1% cholic acid; 20% 106
beef tallow) for 100 days as described [22]. The hyper- 107
lipemic group was divided in two subgroups, one treated 108
with simvastatin (2.5 mg/kg) (*n*=5) and one treated with 109
placebo (*n*=5). Plasma cholesterol levels and hematological 110
parameters were measured at baseline and at sacrifice. 111
Because atherosclerotic lesions develop initially in the 112
abdominal aorta, rings of this vessel were collected and 113
frozen in liquid N₂ to measure gene expression. All 114
procedures were in accordance with institutional guidelines 115
and followed the American Physiological Society and NIH 116
guidelines for animal research. 117

2.3. Plasma biochemistry 118

Plasma total cholesterol was determined with an auto- 119
matic analyzer (Kodak Ektachem DT System). Plasma 120
lipoproteins were fractionated using the validated methods 121
of the Lipid Research Clinic Program [23] and quantified 122
spectrophotometrically (Kontron Instruments). 123

2.4. Lipoprotein isolation 124

Human LDL were isolated from pooled sera of healthy 125
blood donors of the Barcelona area as previously described 126
[20]. The content of protein (BCA protein assay™; Pierce) 127
and cholesterol (Cholesterol assay kit™, RefLab) in the 128
lipoproteins were determined by colorimetric assays. The 129
absence of contamination by other lipoproteins was deter- 130
mined by electrophoresis on agarose gels (Paragon Electro- 131
phoresis kit, Beckman). Lipoproteins were endotoxin free, 132
as determined by the Limulus Amebocyte Lysate pyrogen 133
testing system (Biowhittaker Inc.), and did not contain any 134
detectable levels of thiobarbituric-acid-reactive substances 135
(TBARS). 136

2.5. RT-PCR 137

Total RNA was isolated using Ultraspec™ (Biotex 138
Laboratories) according to the manufacturer's recommen- 139
dations and was reverse-transcribed. NOR-1 mRNA levels 140
were analyzed by polymerase chain reaction (PCR) using 141
the PCR DIG Labeling Mix (Roche) as described [2]. The 142
specific NOR-1 oligonucleotides used were: 5'-AGGGCT- 143
GCAAGGGCTTTTTCAAGAGA-3' and 5'-TGCTTTCTA- 144
CAGGAGCTGCT-3'. The specific *c-fos* oligonucleotides 145
used were: 5'-CATCATCCAGGCCAGTG-3' and 5'- 146
CTGAGCGAGTCAGAGGAAGG-3'. For both genes 147
amplification was carried out by 24 cycles: denaturation 148
94 °C for 30 s; annealing, 61 °C for 1 min and 149
polymerization, 72 °C for 1 min 30 s. PCR products 150
were resolved by electrophoresis in agarose gels and 151
transferred onto nylon membranes (Nytran™ plus; 152

153 Schleicher and Shuell) by a standard capillary technique.
 154 Blots were UV cross-linked. Detection of digoxigenin-
 155 labeled nucleic acids was performed with an anti-
 156 digoxigenin antibody linked to alkaline phosphatase and
 157 disodium 3-(4-methoxy Spiro{1,2-dioxetano-3,2'-(5'-chloro-
 158 o)trycyclo[3.3.1.1.1 [3,7]]Decan}-4-yl) phenylphosphate
 159 (CSPD) was used as substrate. Levels of glyceraldehyde-
 160 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) were used to
 161 normalize results [2,3].

162 2.6. Real-time PCR

163 The inhibitory effect of simvastatin on NOR-1 mRNA
 164 levels was quantified using real-time PCR. Total RNA was
 165 obtained as described above. Assays-on-Demand™ (Applied
 166 Biosystems) of TaqMan™ fluorescent real-time PCR primers
 167 and probes were used for NOR-1 (Hs00175077_m1) and for
 168 GAPDH (4326317E) and 18 S ribosomal RNA (4319413E)
 169 as endogenous controls.

170 2.7. Determination of DNA synthesis

171 Arrested human VSMC were stimulated with LDL (30
 172 mg protein/dL) in medium containing 0.5 μ Ci/mL of
 173 [3 H]thymidine (Amersham) in the presence or absence of
 174 simvastatin, mevalonate, geranylgeranyl or farnesol, and
 175 [3 H]thymidine incorporation was determined as described
 176 [2,3].

177 2.8. Western blot analysis

178 Human VSMC were cultured and stimulated with
 179 lipoproteins as indicated above in presence or absence of
 180 simvastatin. Cell monolayers were washed with PBS and
 181 lysed with lysis buffer [1% SDS in 10 mmol/L Tris–HCl
 182 (pH 7.4), 1 mmol/L ortovanadate] or with Subcellular
 183 Proteome Extraction kit (Calbiochem) to obtain membrane
 184 and cytoplasmic protein. Proteins were analyzed by
 185 Western blot analysis as described previously [16]. Blots
 186 were incubated with an antibody against human CREB
 187 phosphorylated in Ser¹³³ (C9102; Sigma); human CREB
 188 (C-21; Santa Cruz Biotechnology); human RhoA (26C4,
 189 Santa Cruz Biotechnology); human myosin heavy chain
 190 isoforms (SMemb, SM1 and SM2) [24] kindly provided by
 191 Dr. M. Aikawa (Brigham and Women's Hospital, Harvard
 192 Medical School, Boston, USA). Detection was performed
 193 using a horseradish peroxidase-labeled anti-rabbit IgG or
 194 horseradish peroxidase-labeled anti-mouse IgG, and the
 195 Supersignal™ detection system (Pierce). Equal loading of
 196 protein in each lane was verified staining filters with
 197 Ponceau.

198 2.9. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

199 Nuclear extracts (3 μ g) from VSMC and a doubled
 200 stranded probe corresponding to the sequence of human

NOR-1 promoter (from –84 to –41; Nor/3CRE) contain- 201
 ing three putative CRE motifs were used in an EMSA as 202
 described [2]. Super-shift experiments were performed with 203
 antibodies against human CREB (C-21, Santa Cruz 204
 Biotechnology). 205

2.10. CREB binding by ELISA 206

Binding of nuclear extracts from VSMC, obtained with 207
 Transfactor Extraction kit (Clontech), to CRE consensus 208
 oligonucleotides were analyzed by an ELISA based method 209
 using the BD Mercury™ Transfactor CREB-1 kit (Clon- 210
 tech) according to the manufacturer's protocol. 211

2.11. Transient transfection and luciferase assays 212

Rat VSMC were transfected with luciferase expression 213
 vectors using Lipofectamine™ Reagent and Plus™ Reagent 214
 (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. The 215
 constructs used were: pNOR α –1703 containing the human 216
 NOR-1 promoter (from –1703 to +264) [25], kindly 217
 provided by Dr. N. Ohkura (Growth Factor Division, 218
 National Cancer Center Research Institute, Tokyo, Japan), 219
 a RhoA dominant-negative (RhoAT19N) and p-CREB-Luc 220
 (Stratagene) a reporter vector which contains the luciferase 221
 reporter gene driven by a basic promoter element (TATA 222
 box) plus four CRE *cis*-enhancer elements. A reporter 223
 plasmid containing a minimal promoter corresponding to 224
 dihydrofolate reductase was generated cloning this promoter 225
 [26], kindly provided by Dr. C.J. Ciudad (Facultad de 226
 Farmacia, Universidad de Barcelona, Barcelona, Spain), 227
 into PGL-3 basic vector (Promega). The resulting plasmid 228
 (p410-DHFR-Luc) was used to assess that simvastatin did 229
 not affect the overall VSMC transcription rate. Transfected 230
 cells were arrested for 48 h and then were stimulated with 231
 LDL for 4 h. Luciferase activity was measured in cell 232
 lysates using Luciferase assay kit (Promega). pSV β -gal 233
 (Promega) was used as an internal control. 234

2.12. Statistical analysis 235

Results are expressed as mean \pm SEM. A Stat View II 236
 (Abacus Concepts) statistical package for the Macintosh 237
 computer system was used for all analysis: multiple groups 238
 were compared by one-factor ANOVA, followed by Fisher 239
 PLSD to assess specific group differences. 240

3. Results 241

3.1. Statins inhibit NOR-1 up-regulation in VSMC in culture 242 and in vivo in the vessel wall 243

To analyze the effect of statins on NOR-1 mRNA levels 244
 induced by LDL, arrested VSMC were pre-incubated with 245
 simvastatin (increasing concentrations) or atorvastatin (10 246

247 μM) and then were induced with LDL (30 mg/dL, for 1 h).
 248 Statins inhibited LDL-induced NOR-1 expression in a dose-
 249 dependent manner (Fig. 1A).

250 To determine whether the in vitro results were indeed
 251 showing a potential regulation of NOR-1 by statins in the
 252 vascular wall, NOR-1 mRNA levels were analyzed in
 253 abdominal aorta samples from normolipemic pigs and from
 254 animals fed with a hypercholesterolemic diet either treated
 255 or untreated with simvastatin. Plasma cholesterol levels
 256 were higher in hypercholesterolemic animals as a result of
 257 an increase in LDL levels, and they were not significantly
 258 modified by simvastatin (Table 1). NOR-1 mRNA levels
 259 were highly increased in abdominal aorta of hypercholes-
 260 terolemic animals and they were significantly decreased by
 261 simvastatin treatment (Fig. 1B).

262 3.2. Geranylgeranylated proteins are key in DNA synthesis
 263 and NOR-1 expression induced by LDL

264 LDL-induced VSMC DNA synthesis inhibited by
 265 simvastatin was completely restored by mevalonate o
 266 geranylgeranyol but not by farnesol (Fig. 2A). Interestingly,
 267 simvastatin-inhibited NOR-1 expression was also specifi-
 268 cally prevented by geranylgeranyol (Fig. 2B). In contrast,

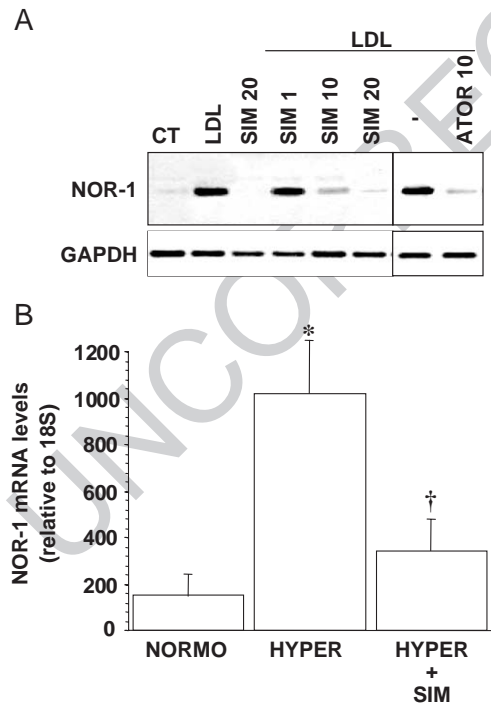


Fig. 1. Simvastatin inhibits NOR-1 expression in LDL-induced human VSMC and in abdominal aorta of hyperlipemic pigs. A. RT-PCR showing NOR-1 expression in human coronary SMC treated with simvastatin (SIM 1, 10 or 20 $\mu\text{mol/L}$) or atorvastatin (ATOR, 10 $\mu\text{mol/L}$) and stimulated with LDL (30 mg/dL, 1 h). Blots are representative of three independent experiments. B. Real time PCR showing NOR-1 expression in abdominal aorta samples from normolipemic pigs (NORMO) and from animals feed with a hyperlipemic diet (HYPER) treated or not with simvastatin (HYPER+SIM). $P < 0.05$: *vs. NORMO; †vs. HYPER.

Table 1
 Plasma lipid profile in normolipemic, hyperlipemic and hyperlipemic/
 simvastatin pigs

	Normolipemic	Hyperlipemic	Hyperlipemic+ SIM
Total cholesterol, mg/dL	82.0 \pm 7.3	590.0 \pm 70.6*	452.0 \pm 71.0*
LDL cholesterol, mg/dL	49.3 \pm 6.3	443.5 \pm 19.2*	454.7 \pm 72.2*

Results are mean \pm SD.
 * $P < 0.05$ vs normolipemic animals.

farnesol but not geranylgeranyol restored simvastatin-
 inhibited *c-fos* expression levels. Mevalonate, geranylger-
 anyol and farnesol alone did not produce any effect on basal

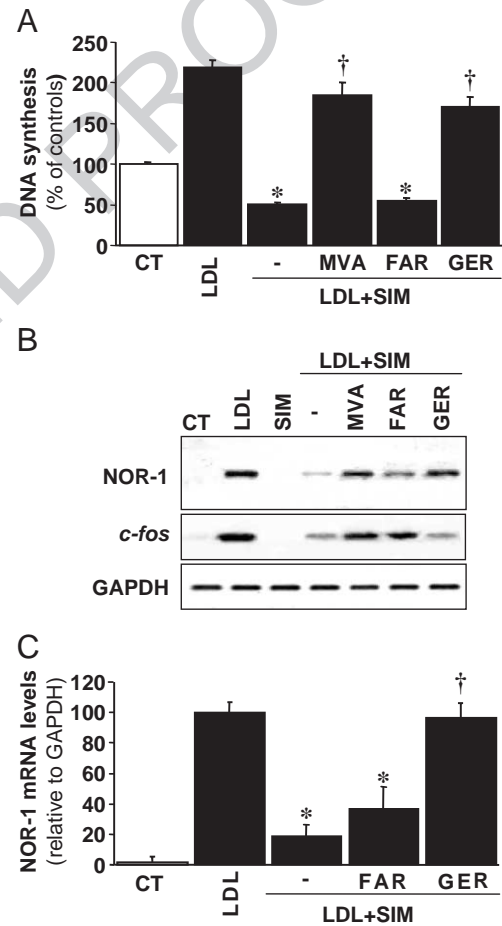


Fig. 2. Simvastatin inhibition of DNA synthesis and NOR-1 expression induced by LDL is dependent on geranylgeranylated proteins. A. DNA synthesis (^3H)thymidine incorporation) in VSMC stimulated with LDL in the presence or absence of simvastatin (SIM, 20 $\mu\text{mol/L}$). The effect of mevalonate (MVA, 100 $\mu\text{mol/L}$), farnesol (FAR, 15 $\mu\text{mol/L}$) and geranylgeranyol (GER, 15 $\mu\text{mol/L}$) on SIM inhibition of DNA synthesis is shown. Results represent the mean \pm SEM of three independent experiments performed in triplicate. B. NOR-1 and *c-fos* mRNA levels in VSMC treated as indicated in A. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as a control. Blots are representative of three independent experiments. C. Quantitative real-time PCR data showing the inhibition by simvastatin (20 $\mu\text{mol/L}$) on LDL-induced NOR-1 mRNA levels and the reversion by GER. Results represent the mean \pm SEM of three independent experiments performed in triplicate. $P < 0.05$: *vs. LDL-treated cells; †vs. LDL/SIM and LDL/SIM/FAR. CT, control (non-induced cells).

272 NOR-1 expression (data not shown). Using real-time PCR
 273 we determined that the inhibitory effect of simvastatin on
 274 NOR-1 expression levels was completely abrogated by
 275 geranylgeranyl while farnesol did not produced a signifi-
 276 cant effect (Fig. 2C).

277 3.3. RhoA/ROCK pathway is involved in NOR-1 up-
 278 regulation by LDL

279 Simvastatin interfered isoprenylation of RhoA (Fig.
 280 3A), a geranylgeranylated protein involved in cell signal-
 281 ing [27,28] that could be implicated in NOR-1 up-

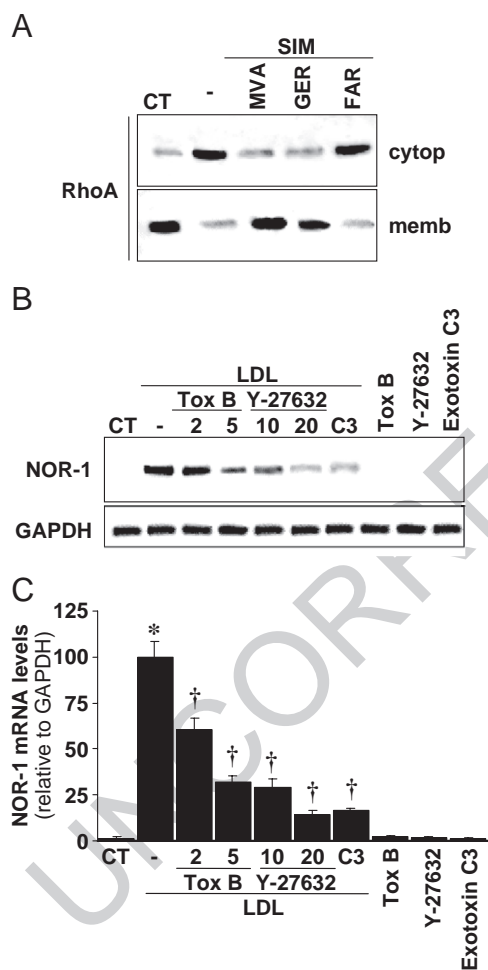


Fig. 3. RhoA is involved in NOR-1 up-regulation by LDL. A. Western blot showing the inhibition of RhoA isoprenylation by simvastatin. RhoA protein levels in cytoplasm (cytop) and membrane (memb.) of VSMC treated with simvastatin alone (SIM, 20 μ mol/L) or simvastatin plus mevalonate (MVA, 100 μ mol/L), geranylgeranyl (GER, 15 μ mol/L) or farnesol (FAR, 15 μ mol/L). Blots are representative of three independent experiments. B. NOR-1 mRNA levels analyzed by RT-PCR corresponding to human VSMC stimulated with LDL (30 mg/dL for 1 h) in the absence or presence of toxin B (Tox B, 2 or 5 ng/mL), Y-27632 (10 or 20 μ mol/L) or exotoxin C3 (25 μ mol/L). Blots are representative of three independent experiments. C. Graph showing the densitometric results of blots shown in B. Data are mean \pm SEM. $P < 0.05$: *vs Control cells; †vs cells treated with LDL alone. CT, control (non-induced cells).

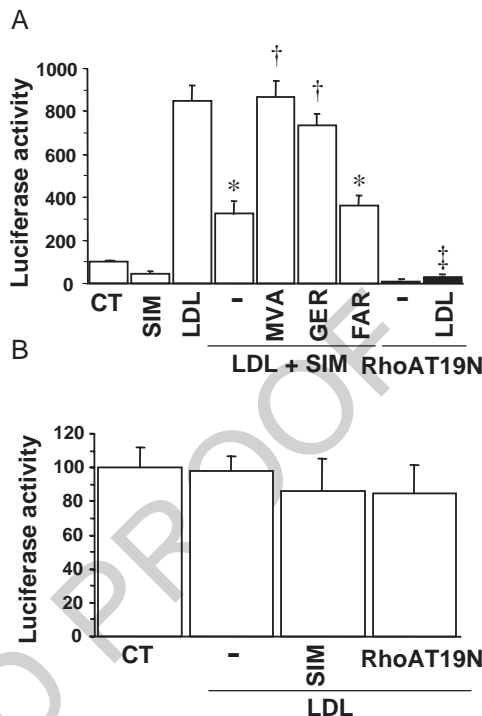


Fig. 4. Simvastatin inhibits LDL-induced NOR-1 promoter activity. A. Rat VSMC were transfected with pNOR α -1703 (white bars). Arrested cells were induced with LDL (30 mg/dL for 4 h) in the presence of simvastatin alone (SIM, 20 μ mol/L) or simvastatin plus mevalonate (MVA, 100 μ mol/L), geranylgeranyl (GER, 15 μ mol/L) or farnesol (FAR, 15 μ mol/L). Black bars show the results corresponding to the cotransfection with pNOR α -1703 and RhoAT19N. CT, control (non-induced cells). Results represent the mean \pm SEM of three independent experiments performed in triplicate. $P < 0.05$: *vs cells treated with LDL alone; †vs cells treated with LDL + SIM; ‡vs cells treated with LDL and transfected with pNOR α -1703 alone. B. Luciferase activity corresponding to cells transfected with a reporter plasmid containing a minimal promoter (p410-DHFR-Luc). Experimental conditions are indicated in A. CT, control (non-induced cells). Results represent the mean \pm SEM of three independent experiments performed in triplicate.

regulation. In agreement with this result several inhibitors
 of the RhoA/ROCK pathway (tox B [an inhibitor of Rho
 family of small GTPases], exotoxin C3 [an inhibitor of
 RhoA] and Y-27632 [an inhibitor of ROCK]) mimicked
 the inhibitory effect of simvastatin on NOR-1 expression

In cells transfected with a construct containing NOR-1
 promoter (pNOR α -1703) simvastatin was also able to
 inhibit NOR-1 promoter activity, effect that was reverted by
 mevalonate and geranylgeranyl, but not by farnesol (Fig.
 4A). In addition, in co-transfection experiments RhoAT19N
 (a RhoA dominant-negative) prevented LDL-induced NOR-1
 promoter activity. In contrast, neither simvastatin nor
 RhoAT19N significantly modified the transcriptional activi-
 ty of a minimal promoter (p410-DHFR-Luc) [26] (Fig. 4B).
 These results suggest that the inhibitory effect produced by
 both simvastatin and RhoAT19N on NOR-1 transcriptional
 activity was not due to a general (unspecific) inhibitory
 effect on cell transcription rate.

301 3.4. Simvastatin inhibits CREB phosphorylation and activity

302 Since CREB is a key transcription factor involved in
 303 LDL-induced NOR-1 expression [3], we analyzed the effect
 304 of simvastatin on CREB. To analyze the effect of
 305 simvastatin on CREB binding, nuclear extracts from VSMC
 306 preincubated with simvastatin and induced with LDL were
 307 analyzed by EMSA and ELISA. Simvastatin did not
 308 influence the binding of CREB either to specific sequences
 309 containing CRE sites present in NOR-1 promoter (analyzed
 310 by EMSA) (Fig. 5A) or to consensus CRE sequences
 311 (analyzed by ELISA) (Fig. 5B). However, simvastatin
 312 significantly inhibited early CREB phosphorylation induced
 313 by LDL by $64 \pm 5.8\%$ (Fig. 6) (CREB phosphorylated levels:
 314 $100 \pm 5\%$ in LDL-treated cells versus $36 \pm 5.8\%$ in
 315 LDL+simvastatin-treated cells). This inhibitory effect was
 316 reverted by mevalonate and geranylgeranyl but not by
 317 farnesol. Exotoxin C3 and Y-27632 mimicked the inhibitory
 318 effect produced by simvastatin.

319 Finally, in transfection experiments both simvastatin
 320 treatment and RhoAT19N-transfection significantly reduced
 321 the transcriptional activity of a reporter plasmid containing 4
 322 CRE sites (p-CRE-Luc) (Fig. 7A). In addition, to evidence
 323 whether simvastatin could specifically modulate the expres-
 324 sion of other CREB-dependig genes, we analyzed the

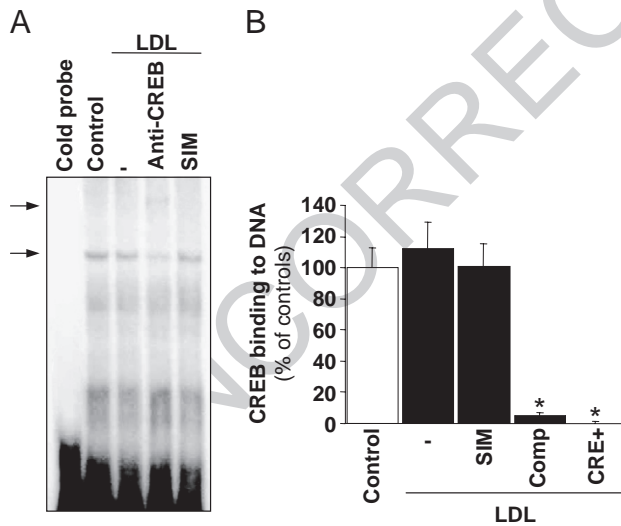


Fig. 5. Simvastatin does not inhibit CREB–CRE binding. A. EMSA showing the ability of nuclear extracts from human VSMC to bind to the probe Nor/3CRE. Neither LDL nor simvastatin affected CREB binding to CRE motifs present in NOR-1 promoter. The super-shift effect of anti-CREB antibodies is shown. Blots are representative of three independent experiments. B. Binding of CREB to consensus CRE sequences analyzed by ELISA (see Methods). The results corresponding to nuclear extracts (20 µg) from control cells and from cells induced with LDL (30 mg/mL, 10 min) in the presence or absence of SIM (20 µmol/L) is shown. Control: non-induced cells; Comp: 20 µg of competitor oligodeoxynucleotides+nuclear protein of cells induced with LDL; CRE⁺: Mutant DNA-Coated well control+nuclear protein of cells induced with LDL. Results represent the mean±SEM (n=3 independent experiments performed in triplicate). P<0.05: *vs Control cells or cells treated with LDL alone or LDL+SIM.

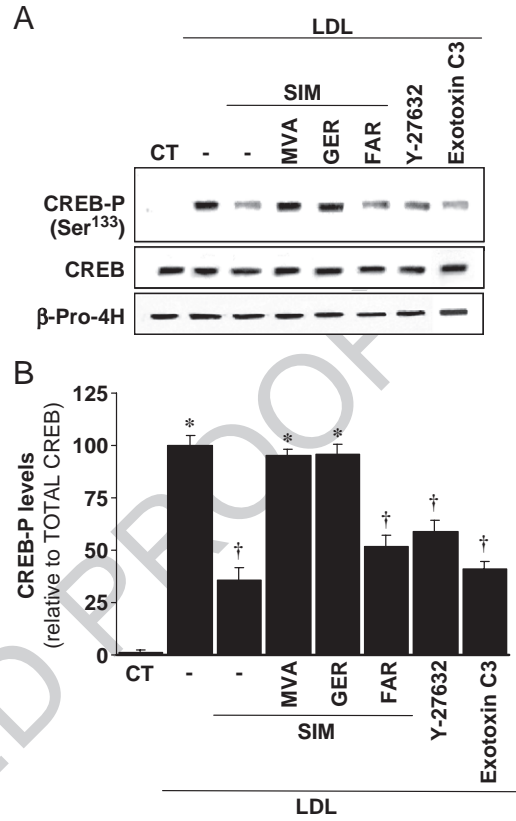


Fig. 6. Simvastatin inhibits CREB activation. A. Western blot from human VSMC showing CREB activation (phosphorylation in Ser¹³³) by LDL (30 mg/dL, 10 min) and its inhibition by simvastatin (SIM, 20 µmol/L), and Y-27632 (20 µmol/L) and exotoxin C3 (C3, 25 µmol/L). The effect of mevalonate (MVA, 100 µmol/L), geranylgeranyl (GER, 15 µmol/L) and farnesol (FAR, 15 µmol/L) on SIM effect is shown. Blots are representative of three independent experiments. B. Graph showing the densitometric results of the experiments shown in A. Data are mean±SEM. P<0.05: *vs Control cells; †vs cells treated with LDL alone, with LDL+SIM+MVA or with LDL+SIM+GER. CT, control (non-induced cells).

effect of simvastatin on non-muscle myosin heavy chain-B (also known as SMemb) [29]. Indeed, simvastatin inhibited LDL-induced protein expression levels of SMemb, without modification of other SMC markers non-regulated by CREB (SM1 and SM2) (Fig. 7B,C).

4. Discussion

NOR-1 is a member of the NGFI-B family of orphan nuclear receptors involved in cell proliferation in different cell types including VSMC [2,3,5,30], that is induced by coronary angioplasty in vivo [2] and is over-expressed in atherosclerotic lesions from CAD patients [2,4]. Recently, we have show that NOR-1 is involved in LDL-induced VSMC proliferation and that LDL induces NOR-1 expression by a CREB-dependent mechanism [3]. Here, we show that simvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor that inhibits VSMC proliferation [15,16], inhibits the NOR-1 up-regulation induced by hyperlipidemia in the vascular wall of

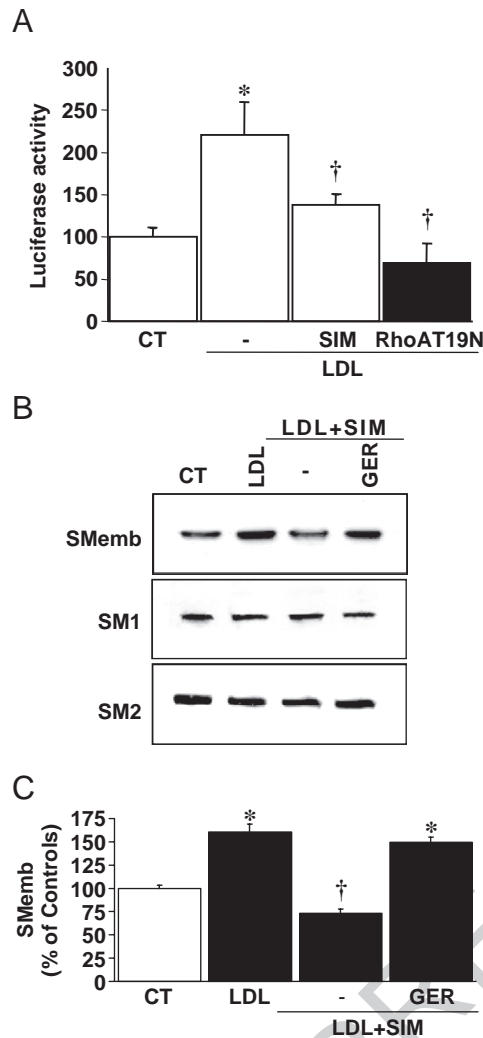


Fig. 7. Simvastatin potentially regulates other CREB-dependent genes. A. Simvastatin and the RhoA dominant negative (RhoAT19N) inhibit the promoter activity induced by LDL (30 mg/dL for 4 h) of a construct composed only of CRE boxes (p-CREB-Luc). CT, control (non-induced cells); p-CREB-Luc alone (white bars); cotransfection with RhoAT19N (black bar). Results represent the mean \pm SEM of three independent experiments performed in triplicate. $P < 0.05$: *vs control cells (CT); †vs cells treated with LDL alone. B. Western blots showing levels of SMemb and other VSMC markers (SM1 and SM2) in cells exposed to LDL (30 mg/dL for 24 h) in the presence or absence of simvastatin (20 μ mol/L) and geranylgeranyol (GER, 15 μ mol/L). C. Graph showing the result corresponding to the quantification of SMemb protein levels. Data from two independent experiments performed in triplicate. $P < 0.05$: *vs Control cells; †vs cells treated with LDL alone or with LDL+SIM+GER. CT, control (non-induced cells).

342 hypercholesterolemic pigs and in LDL-induced VSMC, by
343 interfering RhoA signaling and CREB activation.

344 Simvastatin, at concentrations that efficiently inhibit cell
345 proliferation, inhibits NOR-1 expression induced by LDL in
346 human VSMC. In addition, in the porcine model simvastatin
347 prevented the up-regulation of NOR-1 observed in the
348 abdominal aorta of animals fed with a hyperlipemic diet.
349 Under our experimental conditions of prolonged admin-
350 istration of a cholesterol and saturated fat rich diet (100

days) to promote cholesterol intestinal absorption, simvas- 351
tatin did not significantly reduced plasma LDL-cholesterol 352
levels but strongly reduced NOR-1 expression in the porcine 353
vessels (quantitatively assessed by real time PCR). These 354
results suggest a direct effect of simvastatin on the vascular 355
wall, which is in concordance with previous results showing 356
vascular effect of these drugs unrelated with plasma 357
cholesterol lowering [15–18]. 358

The effect of simvastatin on both DNA synthesis and 359
NOR-1 expression induced by LDL in VSMC was reverted 360
by geranylgeranyol but not by farnesol. In contrast, the 361
LDL-induced expression of *c-fos* was reverted by farnesol 362
but not by geranylgeranyol, consistent with the well-known 363
role of Ras (a farnesylated protein) in *c-fos* up-regulation 364
[31]. Our present results suggest a prominent role of NOR-1 365
over other genes, such as the proto-oncogene *c-fos*, in the 366
growth-related effects promoted by LDL in VSMC. 367

Regarding geranylgeranylated proteins involved in these 368
effects, RhoA seems to play a key role because simvastatin 369
interfered with RhoA membrane translocation and inhibitors 370
of RhoA (exotoxin C3), Rho proteins (toxin B) or ROCK 371
(Y-27632) mimicked the simvastatin inhibitory effect on 372
NOR-1 expression. The critical role of Rho in the 373
simvastatin anti-proliferative effects on VSMC is in agree- 374
ment with previous papers showing that VSMC prolifera- 375
tion inhibited by statins is highly dependent on 376
geranylgeranylated proteins [19,32,33]. In fact, newly 377
synthesized RhoA is isoprenylated and translocated to 378
membranes coincident with progression of the G1 to S 379
phase in growing cells [34], and the down-regulation of 380
p27^{Kip1} by RhoA mediates the induction of DNA synthesis 381
in VSMC [33,35]. Previously we showed that LDL-induced 382
NOR-1 is mediated by GPCR, from our present data we 383
propose that NOR-1 up-regulation by LDL would be 384
modulated by GPCR-dependent pathways via RhoA/ 385
ROCK. In fact, the RhoA/ROCK pathway is a mediator 386
of GPCR signaling [36] which play a crucial role regulating 387
different processes including cell cycle and growth pro- 388
cesses and that has been involved in neointimal formation in 389
balloon-injured arteries [37]. 390

Since LDL induced NOR-1 in a CREB-dependent 391
manner [3], we analyze whether simvastatin could modu- 392
late NOR-1 preventing CREB function. Neither LDL nor 393
simvastatin affected CREB binding to CRE boxes present 394
in the NOR-1 promoter or to oligonucleotides containing 395
consensus CRE sequences, according with the ability of 396
CREB to constitutively bind to its response element [38]. 397
However, simvastatin significantly reduced CREB activa- 398
tion (phosphorylation in Ser¹³³) and NOR-1 promoter 399
activity in cell transfected with a luciferase reporter system. 400
In addition, specific inhibition of RhoA or ROCK also 401
reduced CREB phosphorylation, and a RhoA dominant 402
negative (RhoAT19N) completely prevented NOR-1 promoter 403
activity. Therefore, our results show that in VSMC 404
functional RhoA is required for LDL-induced cell signal- 405
ing leading to CREB activation. The inhibition of CREB 406

407 by statins could be relevant beyond NOR-1 down-
 408 regulation because recent papers argue for a main role of
 409 CREB in VSMC survival/proliferation and vascular
 410 remodeling processes [39–41]. In fact, our results using
 411 a reporter plasmid containing 4 CRE boxes (p-CRE-Luc)
 412 suggest that simvastatin could potentially regulate other
 413 genes containing functional CRE sites. Moreover, we show
 414 that LDL induced while simvastatin inhibited the protein
 415 levels of SMemb, a marker for dedifferentiated VSMC,
 416 that increases in intimal SMC of hypercholesterolemic
 417 animal models [42] and after balloon angioplasty [43].
 418 Since SMemb is activated by CREB (through a functional
 419 CRE site present in its promoter) [29], we could consider
 420 that LDL may up-regulate its expression through a CREB-
 421 dependent mechanism while simvastatin reverts this effect
 422 on the basis of its interference in RhoA and CREB
 423 activation. However, further experiments are needed to
 424 demonstrate this relationship.

425 In summary, the vascular effects of LDL could be
 426 modulated by simvastatin treatment both by controlling
 427 plasma LDL levels and by directly regulating cell signaling
 428 pathways. Our results emphasize the role of RhoA in the
 429 growth promoting effects induced by LDL and suggest that
 430 NOR-1 and CREB could be key transcription factors
 431 mediating the in vivo effects of statins on the vascular wall.
 432 Further studies, including immunohistochemical analyses,
 433 are needed to confirm the involvement of NOR-1 in the
 434 vascular effects of statins.

435 Acknowledgments

436 This work has been possible thanks to funds provided by
 437 FIS-PI020361, FIS C03-01/Recava the Freedom to Discover
 438 Program of Bristol–Myers Squibb Foundation (USA) and
 439 Catalana-Occidente. We thank Dr. M. Aikawa, for providing
 440 the antibodies against human MHC isoforms and Dr. C.J.
 441 Ciudad for the p410-DHFR minimal promoter. We thank
 442 Guthrie cDNA Resource Center (www.cdna.org) for the gift
 443 of the RhoAT19N construction. The authors thank Dra.
 444 Sonia Sanchez from the animal facility of our center and the
 445 Heart Transplant Team of the Division of Cardiology and
 446 Cardiac Surgery of the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau
 447 for their collaboration. Authors are indebted to the technical
 448 assistance provided by Silvia Aguiló. Javier Crespo and
 449 Jordi Rius have been recipients of a Research Fellowship
 450 from Fundació de Investigació Cardiovascular and
 451 DURSI, respectively.

452 References

453

454 [1] Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000;407:233–41.
 455 [2] Martínez-González J, Rius J, Castelló A, Cases-Langhoff C, Badimon
 456 L. Neuron-derived orphan receptor-1 (NOR-1) modulates vascular
 457 muscle cell proliferation. *Circ Res* 2003;92:96–103.

[3] Rius J, Martínez-González J, Crespo J, Badimon L. Involvement of 458
 neuron-derived orphan receptor-1 (NOR-1) in LDL-induced mitogenic 459
 stimulus in vascular smooth muscle cells: role of CREB. *Arterioscler 460*
Thromb Vasc Biol 2004;24:697–702. 461
 [4] Arkenbout EK, de Waard V, van Bragt M, van Ahterberg TA, 462
 Grimbergen JM, Pichon B, et al. Protective function of transcription 463
 factor TR3 orphan receptor in atherogenesis: decreased lesion 464
 formation in carotid artery ligation model in TR3 transgenic mice. 465
Circulation 2002;106:1530–5. 466
 [5] Martínez-González J, Badimon L. The NR4A subfamily of nuclear 467
 receptors: new early genes regulated by growth factors in vascular 468
 cells. *Cardiovasc Res* in press. 469
 [6] Weisser B, Locher R, de Graaf J, Vetter W. Low density lipoprotein 470
 subfractions and [Ca²⁺]_i in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 471
 1993;73:118–24. 472
 [7] Sachinidis A, Ko Y, Wiczorek A, Weisser B, Locher R, Vetter W, et al. 473
 Lipoproteins induce expression of the growth response gene-1 vascular 474
 smooth muscle cells from rat. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 475
 192:794–9. 476
 [8] Libby P, Miao P, Ordovas JM, Schaefer E. Lipoproteins increases 477
 growth of mitogen-stimulated arterial smooth muscle cells. *J Cell 478*
Physiol 1985;124:1–8. 479
 [9] Pintus G, Tadolini B, Posadino AM, Sanna B, Debidda M, Carru C, 480
 et al. PKC/Raf/MEK/ERK signaling pathway modulates native-LDL- 481
 induced E2F-1 gene expression and endothelial cell proliferation. 482
Cardiovasc Res 2003;59:934–44. 483
 [10] Sachinidis A, Seewald S, Epping P, Seul C, Ko Y, Vetter H. The 484
 growth-promoting effect of low-density lipoprotein may be mediated 485
 by a pertussis toxin-sensitive mitogen-activated protein kinase path- 486
 way. *Mol Pharmacol* 1997;52:389–97. 487
 [11] Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. 488
Nature 1990;343:425–30. 489
 [12] Group SSSS. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 490
 patients with coronary heart disease: the Scandinavian simvastatin 491
 survival study (4S). *Lancet* 1994;344:1383–9. 492
 [13] Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, Isles CG, Lorimer AR, MacFarlane 493
 PW, et al. West of Scotland coronary prevention study hypercholester- 494
 olemia. *N Engl J Med* 1995;333:1301–7. 495
 [14] West of Scotland Coronary Prevention Study Group. Influence of 496
 pravastatin and plasma lipids on clinical events in the west of 497
 Scotland coronary prevention study (WOSCOPS). *Circulation* 1998; 498
 97:1440–5. 499
 [15] Lefler AM, Scalia R, Lefler DJ. Vascular effects of HMG CoA- 500
 reductase inhibitors (statins) unrelated to cholesterol lowering: new 501
 concepts for cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 2001;49:281–7. 502
 [16] Liao JK. Beyond lipid lowering: the role of statins in vascular 503
 protection. *Int J Cardiol* 2002;86:5–18. 504
 [17] Williams JK, Sukhova GK, Herrington DM, Libby P. Pravastatin has 505
 cholesterol-lowering independent effects on the artery wall of 506
 atherosclerotic monkeys. *J Am Coll Cardiol* 1998;31:684–91. 507
 [18] Martínez-González J, Alfon J, Berrozpe M, Badimon L. HMG-CoA 508
 reductase inhibitors reduce vascular monocyte chemotactic protein-1 509
 expression in early lesions from hypercholesterolemic swine inde- 510
 pendently of their effect on plasma cholesterol levels. *Atherosclerosis* 511
 2001;159:27–33. 512
 [19] Martínez-González J, Viñals M, Vidal F, Llorente-Cortés V, Badimon 513
 L. Mevalonate deprivation impairs IGF-I/insulin signaling in human 514
 vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 1997;135:213–23. 515
 [20] Martínez-González J, Raposo B, Rodriguez C, Badimon L. 3- 516
 hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibition, prevents 517
 endothelial NO synthase downregulation by atherogenic levels of 518
 native LDLs: balance between transcriptional and posttranscriptional 519
 regulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:804–9. 520
 [21] Dichtl W, Dulak J, Frick M, Alber HF, Schwarzacher SP, Ares MP, 521
 et al. HMG-CoA reductase inhibitors regulate inflammatory tran- 522
 scription factors in human endothelial and vascular smooth muscle 523
 cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:58–63. 524

- 525 [22] Rodriguez C, Martinez-Gonzalez J, Sanchez-Gomez S, Badimon L. 565
526 LDL downregulates CYP51 in porcine vascular endothelial cells and 566
527 in the arterial wall through a sterol regulatory element binding protein- 567
528 2-dependent mechanism. *Circ Res* 2001;88:268–74. 568
- 529 [23] Lipid Research Clinic Program. Manual of Laboratory Operation. 569
530 Washington DC: Department of health, Education, and Welfare 570
531 (DHHS) Publication No NIH75-628. Washington DC: U.S. Govern- 571
532 ment Printing Office; 1974. 572
- 533 [24] Aikawa M, Sivam PN, Kuro-o M, Kimura K, Nakahara K, Takewaki 573
534 S, et al. Human smooth muscle myosin heavy chain isoforms as 574
535 molecular markers for vascular development and atherosclerosis. *Circ 575*
536 *Res* 1993;73:1000–12. 576
- 537 [25] Ohkura N, Ito M, Tsukada T, Sasaki K, Yamaguchi K, Miki K. 577
538 Alternative splicing generates isoforms of human neuron-derived 578
539 orphan receptor-1 (NOR-1) mRNA. *Gene* 1998;211:79–85. 579
- 540 [26] Ciudad CJ, Morris AE, Jeng C, Chasin LA. Point mutational analysis 580
541 of the hamster dihydrofolate reductase minimum promoter. *J Biol 581*
542 *Chem* 1992;267:3650–6. 582
- 543 [27] Van Aelst L, D'Souza-Schorey C. Rho GTPases and signaling 583
544 networks. *Genes Dev* 1997;11:2295–322. 584
- 545 [28] Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature 585*
546 2002;420:629–35. 586
- 547 [29] Sekiguchi K, Kurabayashi M, Oyama Y, Aihara Y, Tanaka T, 587
548 Sakamoto H, et al. Homeobox protein Hex induces SMemb/non- 588
549 muscle myosin heavy chain-B gene expression through the cAMP- 589
550 responsive element. *Circ Res* 2001;88:52–8. 590
- 551 [30] Maruyama K, Tsukada T, Ohkura N, Bandoh S, Hosono T, Yamaguchi 591
552 K. The NGFI-B subfamily of the nuclear receptor superfamily. *Int J 592*
553 *Oncol* 1998;12:1237–43. 593
- 554 [31] Gauthier-Rouviere C, Fernandez A, Lamb NJ. Ras-induced c-fos and 594
555 proliferation in living rat fibroblasts involves C-kinase activation and 595
556 the serum response element pathway. *EMBO J* 1990;9:171–80. 596
- 557 [32] Terano T, Shiina T, Noguchi Y, Tanaka T, Tatsuno I, Saito Y, et al. 597
558 Geranylgeranylpyrophosphate plays a key role for the G1 to S 598
559 transition in vascular smooth muscle cells. *J Atheroscler Thromb 599*
560 1998;5:1–6. 600
- 561 [33] Laufs U, Marra D, Node K, Liao JK. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl- 601
562 CoA reductase inhibitors attenuate vascular smooth muscle prolifer- 602
563 ation by preventing rho GTPase-induced down-regulation of p27 603
564 (Kip1). *J Biol Chem* 1999;274:21926–31. 604
- [34] Noguchi Y, Nakamura S, Yasuda T, Kitagawa M, Kohn LD, Saito Y, 565
et al. Newly synthesized Rho A, not Ras, is isoprenylated and 566
translocated to membranes coincident with progression of the G1 to 567
S phase of growth-stimulated rat FRTL-5 cells. *J Biol Chem* 1998; 568
273:3649–53. 569
- [35] Seasholtz TM, Zhang T, Morissette MR, Howes AL, Yang AH, Brown 570
JH. Increased expression and activity of RhoA are associated with 571
increased DNA synthesis and reduced p27(Kip1) expression in the 572
vasculature of hypertensive rats. *Circ Res* 2001;89:488–95. 573
- [36] Seasholtz TM, Majumdar M, Brown JH. Rho as a mediator of G 574
protein-coupled receptor signaling. *Mol Pharmacol* 1999;55:949–56. 575
- [37] Sawada N, Itoh H, Ueyama K, Yamashita J, Doi K, Chun TH, et al. 576
Inhibition of rho-associated kinase results in suppression of neo- 577
intimal formation of balloon-injured arteries. *Circulation* 2000;101: 578
2030–3. 579
- [38] Mayr B, Montminy M. Transcriptional regulation by the phosphor- 580
ylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 581
2:599–609. 582
- [39] Tokunou T, Shibata R, Kai H, Ichiki T, Morisaki T, Fukuyama K, et al. 583
Apoptosis induced by inhibition of cyclic AMP response element- 584
binding protein in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 2003; 585
108:1246–52. 586
- [40] Bottazzi ME, Buzzai M, Zhu X, Desdouets C, Brecht C, Assoian RK. 587
Distinct effects of mitogens and the actin cytoskeleton on CREB and 588
pocket protein phosphorylation control the extent and timing of cyclin 589
A promoter activity. *Mol Cell Biol* 2001;21:7607–16. 590
- [41] Schneider G, Oswald F, Wahl C, Greten FR, Adler G, Schmid RM. 591
Cyclosporine inhibits growth through the activating transcription 592
factor/cAMP-responsive element-binding protein binding site in the 593
cyclin D1 promoter. *J Biol Chem* 2002;277:43599–607. 594
- [42] Kuro-o M, Nagai R, Nakahara K, Katoh H, Tsai RC, Tsuchimochi H, 595
et al. cDNA cloning of a myosin heavy chain isoform in embryonic 596
smooth muscle and its expression during vascular development and in 597
arteriosclerosis. *J Biol Chem* 1991;266:3768–73. 598
- [43] Aikawa M, Sakomura Y, Ueda M, Kimura K, Manabe I, Ishiwata S, 599
et al. Redifferentiation of smooth muscle cells after coronary 600
angioplasty determined via myosin heavy chain expression. *Circu- 601*
lation 1997;96:82–90. 602
603



ELSEVIER

Atherosclerosis xxx (2005) xxx–xxx

ATHEROSCLEROSIS

www.elsevier.com/locate/atherosclerosis

NOR-1 is involved in VEGF-induced endothelial cell growth

Jordi Rius, José Martínez-González, Javier Crespo, Lina Badimon*

*Centro de Investigación Cardiovascular, CSIC/ICCC, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau,
Sant Antoni Maria Claret # 167, Barcelona 8025, Spain*

Received 28 January 2005; received in revised form 23 March 2005; accepted 27 April 2005

Abstract

Neuron-derived orphan receptor-1 (NOR-1) is a transcription factor over-expressed in human atherosclerotic plaques that is involved in vascular smooth muscle cell proliferation. The aim of this study was to analyze whether NOR-1 plays a role in vascular endothelial growth factor (VEGF) induced endothelial cell growth. VEGF induced an early and transient up-regulation of NOR-1 in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). NOR-1 up-regulation by VEGF is processed through VEGF receptor-2 (VEGFR-2) and involves different signaling pathways including increase in cytosolic Ca^{2+} , activation of protein kinase C and mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways (both extracellular-signaling regulated kinase [ERK] and p38 MAPK). VEGF induced CREB activation (phosphorylation in Ser¹³³). In transfection assays, a dominant-negative of CREB inhibited NOR-1 promoter activity, while mutation of the three CRE sites in the NOR-1 promoter abolished VEGF-induced NOR-1 promoter activity. Antisense oligonucleotides against NOR-1 inhibited VEGF-induced endothelial cell growth (reduced DNA synthesis, and inhibited cell cycle progression and endothelial cell wound repair after mechanical injury). These results indicate that NOR-1 could be a key transcription factor regulating endothelial cell growth induced by VEGF.

© 2005 Published by Elsevier Ireland Ltd.

Keywords: Endothelium; NOR-1; VEGF; Gene expression

1. Introduction

Endothelial cell growth is critical in different processes including the endothelial repair at sites of spontaneous or iatrogenic disruption and the formation of new vessels (neovascularization) [1,2]. In these processes endothelial cells migrate and proliferate as a result of the modulation of gene expression triggered by growth factors. In the last years vascular endothelial growth factor (VEGF) has emerged as a key cytokine that elicits an array of biologic activities in endothelial cells [3,4]. VEGF is essential for endothelial cell growth under physiological conditions and in a variety of disease states including atherosclerosis and cancer [5,6]. However, little is known about early genes that are likely to play a central role regulating VEGF long-term biologic effects [7].

Neuron-derived orphan receptor-1 (NOR-1; also called NR4A3) is an early gene that has been involved in T-cell apoptosis [8], neuronal cell differentiation [9,10] and embryogenesis [11]. Recently, NOR-1 has also been identified as a key gene involved in VSMC proliferation [12,13]. NOR-1 is up-regulated by angioplasty [12], is over-expressed in atherosclerotic lesions from patients with coronary artery disease [12,13] and is induced by growth factors, cytokines and low density lipoproteins in VSMC in culture [12–14]. In endothelial cells NOR-1 is induced by thrombin, serum and VEGF [15,16] but its role in endothelial cell function is unknown.

The aim of this study was to analyze the role of NOR-1 in VEGF-induced cell growth. We show that NOR-1 expression induced by VEGF is dependent on VEGF receptor-2 (VEGFR-2) and involves different signaling pathways that lead to cAMP response element binding protein (CREB)-mediated activation of NOR-1. NOR-1 seems to play a key role in the cell cycle effects induced by VEGF in endothelial

* Corresponding author. Tel.: +34 93 5565880; fax: +34 93 5565559.
E-mail address: lbadimon@csic-iccc.santpau.es (L. Badimon).

57 cells as well as in the re-endothelization process following a
58 mechanical injury.

59 2. Material and methods

60 2.1. Cell culture

61 Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were
62 purchased from Advantcell and were cultured in medium 199
63 (Kibbutz Industries) supplemented with 20 mmol/L HEPES,
64 pH 7.4 (Gibco), 20% of fetal calf serum (FCS, Biologi-
65 cal Industries), 30 μ g/mL of endothelial cell growth sup-
66 plement (Sigma), 2 mmol/L glutamine (Gibco), 1 mmol/L
67 pyruvate (Gibco), 100 μ g/mL heparin (Sigma) and antibi-
68 otics (100 U/mL penicillin and 0.1 mg/mL streptomycin)
69 (Gibco). HUVEC were used between passages 3 and 4. Cells
70 were seeded in multiwell-plates and at subconfluency were
71 arrested with medium containing 10% FCS for 24 h. Ar-
72 rested cells were stimulated with vascular endothelial growth
73 factor-165 (VEGF-165, R&D), 10% human serum (HS),
74 interleukin-1- β (IL-1 β , Amersham), transforming growth
75 factor β (TGF β , Amersham) or placental-derived growth
76 factor (PIGF, R&D). When needed, cells were pretreated
77 with inhibitors for 30 min before stimulus (unless otherwise
78 stated). The inhibitors used were: SU5614 (a VEGF recep-
79 tor inhibitor, Calbiochem), 1,2-bis(2-aminophenoxy)ethano-
80 *N,N,N',N'*-tetraacetic acid tetrakis acetoxymethyl ester
81 (BAPTA-AM, a calcium chelator, Sigma) (added 1 h be-
82 fore stimulus), bisindolylmaleimide I (Bis, a PKC inhibitor,
83 Sigma), 12-(2-cyanoethyl)-6,7,12,13-tetrahydro-13-methyl-
84 5-oxo-5H-indolo[2,3-*a*]pyrrolo[3,4-*c*]carbazole (Gö6976, an
85 inhibitor of calcium-dependent PKCs, Biomol), U0128 (a
86 MEK inhibitor, Calbiochem), SB203580 (a p38 MAPK in-
87 hibitor, Oxford Biomedical Research Inc.).

88 2.2. RT-PCR

89 Total RNA was isolated using UltraspecTM (Biotex Labo-
90 ratories) according to the manufacturer's recommenda-
91 tions and was reverse-transcribed. NOR-1 mRNA levels
92 were analyzed by polymerase chain reaction (PCR) us-
93 ing the PCR DIG Labeling Mix (Roche) as described
94 [12]. The specific NOR-1 oligonucleotides used were:
95 5'-AGGGCTGCAAGGGCTTTTCAAGAGA-3' and 5'-
96 TGCTTTCTACAGGAGCTGCT-3'. Amplification was car-
97 ried out by 24 cycles: denaturation, 94 °C for 30 s; an-
98 nealing, 61 °C for 1 min; and polymerization, 72 °C for
99 1 min 30 s. PCR products were resolved by electrophore-
100 sis in agarose gels and transferred onto nylon mem-
101 branes (NytranTM plus; Schleicher & Shuell) by a stan-
102 dard capillary technique. Blots were UV cross-linked.
103 Detection of digoxigenin-labeled nucleic acids was per-
104 formed with an anti-digoxigenin antibody linked to al-
105 kaline phosphatase and disodium 3-(4-methoxyphospho-
106 ro-3,2'-(5'-chloro)trycyclo[3.3.1.1^{3,7}] Decan-4-yl)
107 phenylphosphate (CSPD) was used as substrate. Levels of

glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) were
used to normalize results [12].

110 2.3. Real-time RT-PCR

111 Total RNA was isolated as indicated above. RNA was re-
112 verse transcribed with Taqman RT Kit (Applied Biosystems)
113 with random hexamers. Assays on-DemandTM (Applied Bio-
114 systems) of TaqManTM fluorescent real-time PCR primers
115 and probes were used for NOR-1 (Hs00175077_m1) and
116 GAPDH (4326317E), that was used as endogenous control.

117 2.4. Western blot

118 HUVEC were stimulated with VEGF as indicated above.
119 Cell monolayers were washed with PBS and lysed with lysis
120 buffer [1% SDS in 10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4), 1 mmol/L
121 ortovanadate]. Proteins were analyzed by Western blot as de-
122 scribed previously [17]. Blots were incubated with an an-
123 tibody against CREB phosphorylated in Ser¹³³ (Sigma) or
124 against total CREB (Santa Cruz Biotechnology). Detection
125 was performed using a horseradish peroxidase-labeled anti-
126 rabbit IgG and the SupersignalTM detection system (Pierce).
127 Equal loading of protein in each lane was verified staining
128 filters with Ponceau.

129 2.5. Construction of NOR-1 promoter constructs

130 The plasmid pNOR α /-1703 containing the human NOR-
131 promoter (from -1703 to +264) was kindly provided by Dr
132 N. Ohkura (Growth Factor Division, National Cancer Center
133 Research Institute, Tokyo, Japan). CRE motifs were mutated
134 by side-directed mutagenesis on pNOR α /-1703 using the
135 QuikChange Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene) as
136 previously described [14].

137 2.6. Transient transfection and luciferase assays

138 HUVEC were transfected with luciferase expression vec-
139 tors (pNOR α /-1703 or with this construct mutated in CRE
140 boxes) using LipofectineTM Reagent (Invitrogen) according
141 to the manufacturer's protocol. Transfected cells were ar-
142 rested for 24 h and then were stimulated with VEGF for
143 4 h. Luciferase activity was measured in cell lysates using
144 Luciferase assay kit (Promega). pSV β -gal (Promega) was
145 used as an internal control. In co-transfection assays a CREB
146 dominant-negative (Clontech) was used.

147 2.7. Determination of DNA synthesis

148 Arrested HUVEC were stimulated with VEGF (50 ng/mL)
149 in medium containing 0.5 μ Ci/mL of [³H]thymidine in pres-
150 ence of absence of phosphorothioate oligodeoxynucleotides
151 (ODNs) against NOR-1 (5'-TTGGACGCAGGGCAT-3') as
152 previously reported in VSMC [12,14]. [³H]thymidine incor-
poration was determined as described [18].

2.8. Cell cycle progression analysis

Arrested HUVEC were stimulated with VEGF (50 ng/mL) for 24 h in presence or absence of the phosphorothioate ODNs against NOR-1. Cells were trypsinized and DNA was stained with propidium iodide with the DNA-Prep™ (Beckman Coulter) according to the manufacturer's recommendations and cell cycle phases were assessed by flow cytometry (Coulter Epics XL) as described [12]. Cell cycle distribution analysis was performed with cyclchred software: <http://www.cardiff.ac.uk/medicine/haematology/cytonetuk/documents/software.htm> from the Department of Haematology of the University of Cardiff (UK).

2.9. In vitro wound healing assay

The ability of antisense NOR-1 ODNs to inhibit endothelial cell wound repair after mechanical injury was assessed in HUVEC in culture as previously described in VSMC [12]. Briefly, confluent growth-arrested HUVEC were injured with a scraper, and then were stimulated with VEGF for 24 h in the presence or absence of the ODNs indicated above. Cells were fixed and stained with methylene blue and images were digitalized by a Sony 3CCD camera. Cell number in the denuded zone was then quantified [12].

2.10. Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm S.E.M. A Stat View II (Abacus Concepts) statistical package for the Macintosh computer system was used for all analysis. Multiple groups were compared by one-factor ANOVA, followed by Fisher PLSD to assess specific group differences.

3. Results

3.1. VEGF induces NOR-1 expression through VEGFR-2

We studied the effect of VEGF, IL-1 β and TGF β in comparison with human serum on NOR-1 expression in endothelial cells. VEGF was a strong NOR-1 inducer, while IL-1 β showed a slightly induction and TGF β did not produce any effect (Fig. 1A). VEGF (0.5–50 ng/mL) induced NOR-1 in a dose-dependent manner (Fig. 1B) reaching maximal expression levels after 1 h of induction (Fig. 1C).

PIGF (a specific VEGFR-1 ligand) did not induce NOR-1; in contrast, SU5614 (a VEGFR-2 inhibitor) abrogated VEGF-induced NOR-1 expression (Fig. 2A). Thus, NOR-1 up-regulation by VEGF seems to be dependent on VEGFR-2 but independent of VEGFR-1. Bisindolylmaleimide I (a general PKC inhibitor) fully inhibited NOR-1 expression, while either BAPTA-AM (a calcium chelator) or Gö6976 (an inhibitor of calcium-dependent PKCs) only modestly inhibited NOR-1 expression (Fig. 2B). These data suggest that both

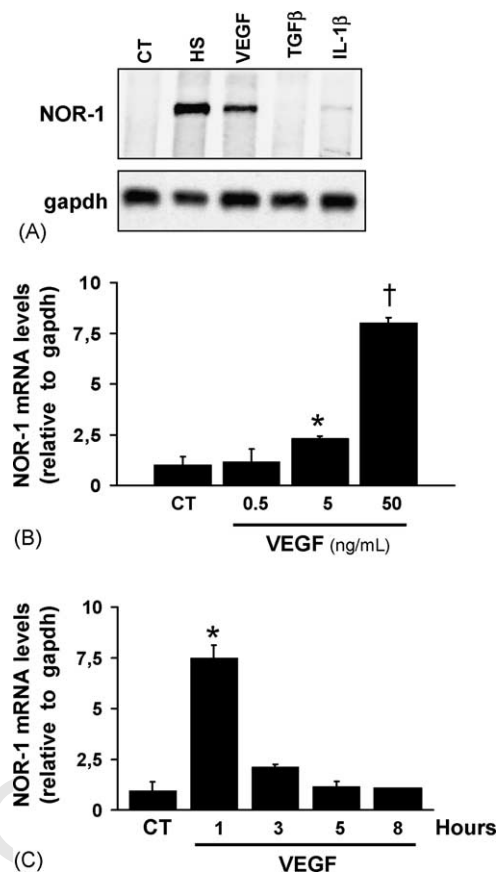


Fig. 1. VEGF induces NOR-1 expression in HUVEC. (A) RT-PCR showing NOR-1 expression in HUVEC induced with 10% human serum (HS), VEGF (50 ng/mL), IL-1 β (1 ng/mL) or TGF β (0.1 nmol/L) during 1 h. Representative blots (three independent experiments performed in duplicate) are shown. (B) Real time RT-PCR showing NOR-1 expression in the presence of increasing concentrations of VEGF (0.5, 5 and 50 ng/mL) (three independent experiments performed in triplicate). (C) HUVEC were induced with VEGF (50 ng/mL) at different times and NOR-1 expression was analyzed by real time RT-PCR (three independent experiments performed in triplicate). $p < 0.05$: * vs. CT; † vs. CT or cells with 0.5 or 5 ng/mL of VEGF.

classical (calcium dependent) and non-classical (calcium independent) PKCs would be involved in NOR-1 expression. In addition, both U0128 (a MEK inhibitor) and SB203580 (a p38 MAPK inhibitor) inhibited NOR-1 expression (Fig. 2B).

3.2. VEGF induces NOR-1 expression through CREB activation

VEGF induced CREB activation (phosphorylation in Ser¹³³) through the same pathways inducing NOR-1 expression. In fact, CREB activation was fully inhibited by bisindolylmaleimide I, U0128 and SB203580 but only partially by a BAPTA-AM or by Gö6976 (Fig. 3A). In contrast, PIGF, that does not induce NOR-1 up-regulation, did not induce CREB activation in accordance with previous studies [19].

We analyzed the role of the three CRE sites present in the NOR-1 promoter that have been shown to be critical for NOR-1 up-regulation in other cell types including VSMC [14,20].

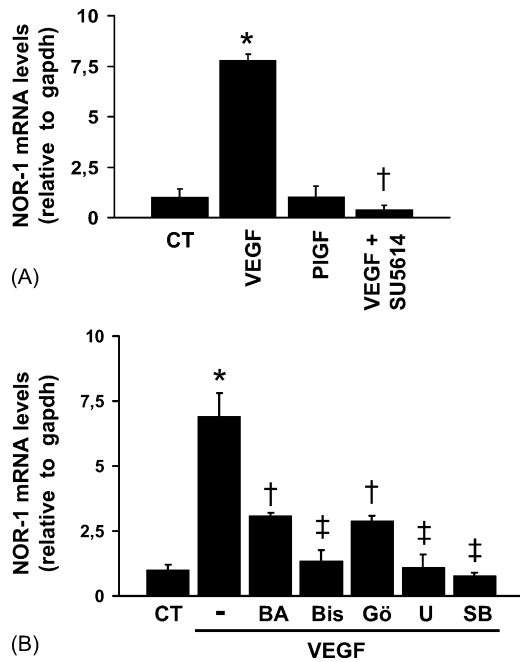


Fig. 2. Signal transduction pathways involved in VEGF-dependent NOR-1 expression. (A) Real-time RT-PCR showing NOR-1 expression in HUVEC treated with VEGF (50 ng/mL), PIGF (50 ng/mL) or VEGF (50 ng/mL)/SU5614 (3 μ mol/L) (three independent experiments performed in triplicate). (B) Real-time RT-PCR showing NOR-1 expression in HUVEC induced with VEGF (50 ng/mL) in the presence of different signaling pathway inhibitors: BAPTA-AM (BA, 15 μ mol/L), bisindolylmaleimide I (Bis, 5 μ mol/L), Gö6976 (Gö, 3 μ mol/L), U0128 (U, 10 μ mol/L) and SB203580 (SB, 5 μ mol/L) (three independent experiments performed in triplicate). $p < 0.05$: * vs. CT; † vs. cells treated with VEGF alone; ‡ vs. cells treated with VEGF plus BAPTA-AM or Gö6976.

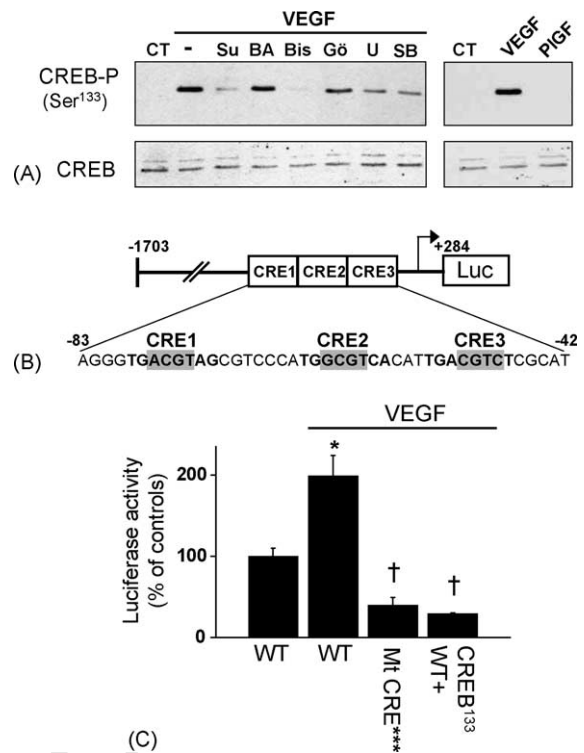


Fig. 3. VEGF induces NOR-1 expression through CREB activation. (A) HUVEC were induced 10 min with VEGF (50 ng/mL) and CREB activation (phosphorylation in Ser¹³³) was analyzed by Western blot. Inhibitors were used as is indicated in Fig. 2. PIGF (50 ng/mL) does not induce CREB activation. Representative blots (three independent experiments performed in triplicate) are shown. (B) Structure of the NOR-1 promoter, the three CRE motifs present in positions from -83 to -42 are shown. CRE sites are indicated in bold, and the bases mutated are boxed. (C) NOR-1 promoter activity was measured as luciferase activity in transfected cells (three independent experiments performed in quadruple). WT, wild-type promoter (pNOR α -1703); Mt CRE^{***}, pNOR α -1703 with the 3 CRE boxes mutated; CREB¹³³, CREB dominant-negative. $p < 0.05$: * vs. control cells transfected with wild-type promoter; † vs. cells transfected with WT and induced with VEGF.

216 In transient transfection experiments, we observed that muta-
 217 tagenesis of these CRE sites abolished VEGF-induced NOR-
 218 1 promoter activity; moreover, cotransfection with a CREB
 219 dominant-negative (CREB mutated in Ser¹³³) significantly
 220 inhibited NOR-1 promoter activity (Fig. 3C). Thus, VEGF
 221 induces NOR-1 promoter activity in a CRE/CREB fashion.

222 3.3. NOR-1 is involved in the regulation of DNA
 223 synthesis in EC

224 In order to assess the role of NOR-1 in endothelial cell
 225 DNA synthesis we used ODNs against NOR-1 (AS-NOR)
 226 which have been previously used to show the involvement
 227 of NOR-1 in VSMC proliferation [12,14]. In the presence
 228 of AS-NOR, VEGF induced DNA synthesis was inhibited,
 229 while the corresponding sense sequence (SE-NOR) did not
 230 have any effect (Fig. 4).

231 3.4. NOR-1 regulates cell cycle progression in
 232 endothelial cells

233 We analyzed by FACS the effect of AS-NOR on VEGF-
 234 induced cell cycle progression. VEGF increased the propor-
 235 tion on endothelial cells in S phase (31.8% in controls ver-

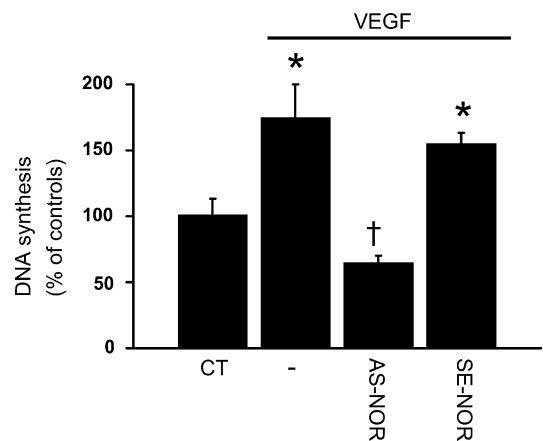


Fig. 4. NOR-1 modulates endothelial cell DNA synthesis. Arrested HUVEC were induced with VEGF (50 ng/mL) for 24 h. ODN (10 μ mol/L) were added 6 h before induction ($n = 3$). AS-NOR, antisense oligonucleotides against NOR-1; SE-NOR, the corresponding sense sequence. $p < 0.05$: * vs. CT cells; † vs. VEGF-treated cells.

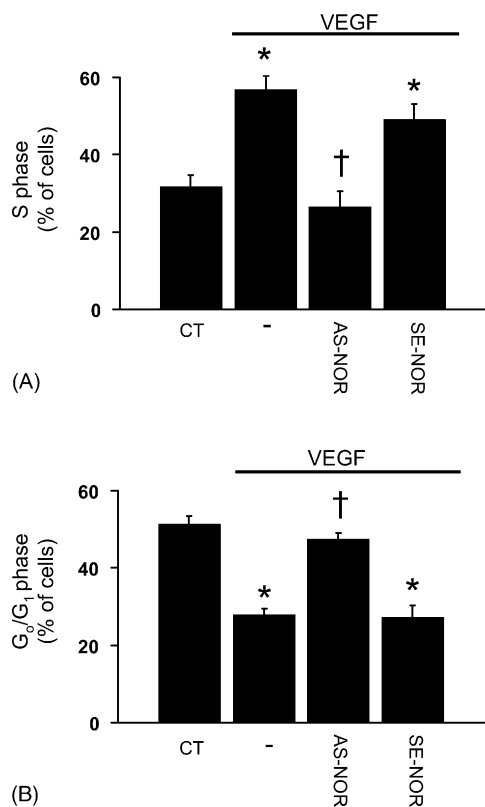


Fig. 5. NOR-1 regulates cell cycle progression in EC. Cells were treated as indicated in Fig. 4 and at the end of the treatment cell cycle distribution was analyzed by FACS. Cell number in each cell cycle phase was quantified using cychchred software ($n = 3$). $p < 0.05$: * vs. CT cells; † vs. VEGF-treated cells.

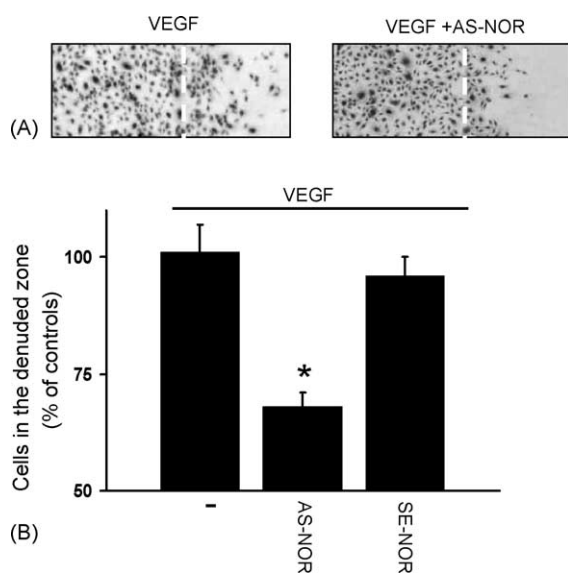


Fig. 6. NOR-1 is involved in endothelial cell wound healing. Arrested endothelial cells were injured with a scraper and induced with VEGF (50 ng/mL). ODN (10 μ mol/L) were added 6 h before induction. 24 h after induction cells were fixed and stained with methylene blue and cells in damage zone were quantified (two independent experiment performed in quintuple). $p < 0.05$: * vs. VEGF-treated cells.

sus 58.9% in VEGF-treated cells) while decreased cells in G₀/G₁ phase (51.4% in controls versus 27.9% in VEGF-treated cells). AS-NOR abolished the effect of VEGF on cell cycle progression (Fig. 5). SE-NOR did not significantly modify cell cycle progression.

3.5. NOR-1 modulates endothelial cell growth in an in vitro model of wound repair

In a well-described model of in vitro wound repair [12,21], we checked the role of NOR-1 in VEGF-induced endothelial cell growth. AS-NOR significantly inhibited VEGF-induced cell re-growth over the damaged zone, while the corresponding sense sequence (SE-NOR) did not produce any effect (Fig. 6).

4. Discussion

We and others have show that NOR-1, an early gene that modulates VSMC proliferation [12,14], is induced by different mitogens including VEGF in endothelial cells [15,16]. In this work, we show that VEGF induces NOR-1 expression in endothelial cells through a mechanism dependent on VEGFR-2 that involves different signaling pathways leading to CREB activation. Specific NOR-1 inhibition prevented VEGF-induced endothelial cell growth suggesting that NOR-1 could be a key transcription factor regulating the endothelial cell proliferative response to VEGF.

We show that the induction of NOR-1 by VEGF is dependent on VEGFR-2 (KDR/Flk-1), the main VEGF receptor mediating both the signal transduction and the biologic responses triggered by VEGF in endothelial cells [7,22]. Different signaling pathways downstream VEGFR-2 were involved in NOR-1 up-regulation including calcium mobilization, activation of both classical and non-classical PKCs, ERK and p38 MAPKs. These pathways are similar to those involved in NOR-1 expression in VSMC [12,14]; although, in endothelial cells both calcium and classical PKCs (i.e. calcium dependent) seem to play a minor role. We observed that the up-regulation of NOR-1 by VEGF is associated to the ability of this cytokine to promote CREB activation (phosphorylation in Ser¹³³) [19]. In fact, both CREB activation and NOR-1 expression induced by VEGF were prevented by interfering the signaling pathways mentioned above. In addition, in transfection assays VEGF induced NOR-1 promoter activity in endothelial cells in a CREB dependent manner. Therefore, NOR-1 is up-regulated through different signaling pathways triggered by VEGF in EC, primarily via VEGFR-2, that “converge” at the level of CREB.

To assess the potential role of NOR-1 in endothelial cell growth we specifically inhibited NOR-1 expression with antisense ODNs as previously shown in VSMC [12,14]. We found that the inhibition of NOR-1 expression decreases both DNA synthesis and cell cycle progression induced by VEGF in endothelial cells. In addition, these ODNs prevented

287 VEGF-induced endothelial cell re-growth in an in vitro model
 288 of wound repair. Although the mechanism involved in NOR-1
 289 dependent cell proliferation is largely unknown, these results
 290 are in agreement with previous findings in VSMC and in other
 291 cell types suggesting a prominent role of this orphan receptor
 292 in cell growth [12,14,23].

293 NOR-1 is a member of the NR4A subfamily of nuclear
 294 receptors originally identified in forebrain neural cells under-
 295 going apoptosis [24]. NOR-1 as well as the other two closely
 296 related members of the NR4A subfamily, Nur77 (also known
 297 as nerve growth factor (NGF)-induced clone B [NGFI-B])
 298 and Nurr1 (Nur-related factor 1) have been involved in dif-
 299 ferent cell processes including apoptosis [8], cell differentia-
 300 tion [9,10] and proliferation [12–14,23]. Unlike most nuclear
 301 receptors whose transcriptional activity is regulated by direct
 302 modulatory ligands, NR4A genes do not appear to require
 303 ligand binding for activation [25–27]; in contrast, in vascular
 304 cells they are highly responsive to growth factors, cytokines,
 305 lipoproteins and thrombin [12–14,23]. These nuclear recep-
 306 tors are highly homologous and they all are early induced
 307 by growth factors (including VEGF) through similar signal-
 308 ing pathways [15,16,23,28]; however, they exhibit significant
 309 differences, among them in their ability to dimerize and to
 310 bind to closely related response elements [23,29,30]. In ad-
 311 dition, although in some systems these genes could play re-
 312 dundant functions, for instance NOR-1 and Nur-77 are both
 313 involved in T-cell apoptosis [8], recent results suggest that
 314 they could play opposite roles in vascular cell proliferation
 315 [12–14,31]. Indeed, Nur77 over-expression inhibited both en-
 316 dothelial cells and VSMC proliferation [13,31], while NOR-
 317 1 inhibition reduces the proliferation of both VSMC [12,14]
 318 and endothelial cells, as we show here. Finally, while results
 319 from Nur77 deficient mice suggested a redundant function
 320 for this subfamily of genes in T-cell apoptosis [8], null mice
 321 for NOR-1 were not viable indicating that the role of NOR-1
 322 could not be undertaken by the other members [11]. There-
 323 fore, the elucidation of the downstream genes regulated by
 324 these orphan receptors will shed more light on their specific
 325 functions on different cell types.

326 In summary, NOR-1 has emerged as a potentially rele-
 327 vant player in the complex network of transcription factors
 328 that regulate endothelial cell growth. Since endothelial cell
 329 proliferation is key in the angiogenic processes associated
 330 to atherosclerosis and cancer [5,6,32], NOR-1 could be re-
 331 garded as a new target in future therapeutic strategies for these
 332 pathologies.

333 **Acknowledgments**

334 This work has been possible due to the to funds provided
 335 by FIS-PI02036, FIS-C0301 (Recava), the Freedom to Dis-
 336 cover Program of Bristol-Myers Squibb Foundation (USA)
 337 and Catalana-Occidente. We thank Dr. N. Ohkura for kindly
 338 providing the pNOR α –1703 and the Heart Transplant Team
 339 of the Division of Cardiology and Cardiac Surgery of the Hos-

pital de la Santa Creu i Sant Pau for their collaboration. We
 thank Berta Raposo for her help in FACS analysis. Authors
 are indebted to the technical assistance provided by Silvia
 Aguiló. Jordi Rius and Javier Crespo have been recipients of
 Research Fellowships from DURSI and Fundación de Inves-
 tigación Cardiovascular, respectively.

346 **References**

[1] Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 2003;9:653–60. 347
 [2] Hutter R, Carrick FE, Valdiviezo C, et al. Vascular endothelial 348
 growth factor regulates re-endothelialization and neointima formation 349
 in a mouse model of arterial injury. *Circulation* 2004;110:2430–5. 350
 [3] Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its 351
 receptors. *Nat Med* 2003;9:669–76. 352
 [4] Ruhrberg C. Growing and shaping the vascular tree: multiple roles 353
 for VEGF. *BioEssays* 2003;25:1052–60. 354
 [5] Isner JM. Cancer and atherosclerosis: the broad mandate of angio- 355
 genesis. *Circulation* 1999;99:1653–5. 356
 [6] Moulton KS. Plaque angiogenesis and atherosclerosis. *Curr* 357
Atheroscler Rep 2001;3:225–33. 358
 [7] Zachary I. VEGF signalling: integration and multi-tasking in en- 359
 dothelial cell biology. *Biochem Soc Trans* 2003;31:1171–7. 360
 [8] Cheng LE, Chan FK, Cado D, Winoto A. Functional redundancy of 361
 the Nur77 and Nor-1 orphan steroid receptors in T-cell apoptosis. 362
EMBO J 1997;16:1865–75. 363
 [9] Ohkura N, Hijikuro M, Miki K. Antisense oligonucleotide to NOR- 364
 1, a novel orphan nuclear receptor, induces migration and neurite 365
 extension of cultured forebrain cells. *Brain Res Mol Brain Res* 366
 1996;35:309–13. 367
 [10] Ponnio T, Conneely OM. NOR-1 regulates hippocampal axon guid- 368
 ance, pyramidal cell survival, and seizure susceptibility. *Mol Cell* 369
Biol 2004;24:9070–8. 370
 [11] DeYoung RA, Baker JC, Cado D, Winoto A. The orphan steroid 371
 receptor Nur77 family member Nor-1 is essential for early mouse 372
 embryogenesis. *J Biol Chem* 2003;278:47104–9. 373
 [12] Martínez-González J, Rius J, Castello A, Cases-Langhoff C, Badi- 374
 mon L. Neuron-derived orphan receptor-1 (NOR-1) modulates vas- 375
 cular smooth muscle cell proliferation. *Circ Res* 2003;92:96–103. 376
 [13] Arkenbout EK, de Waard V, van Bragt M, et al. Protective function of 377
 transcription factor TR3 orphan receptor in atherogenesis: decreased 378
 lesion formation in carotid artery ligation model in TR3 transgenic 379
 mice. *Circulation* 2002;106:1530–5. 380
 [14] Rius J, Martínez-González J, Crespo J, Badimon L. Involvement 381
 of neuron-derived orphan receptor-1 (NOR-1) in LDL-induced mit- 382
 ogenic stimulus in vascular smooth muscle cells: role of CREB. 383
Arterioscler Thromb Vasc Biol 2004;24:697–702. 384
 [15] Martínez-González J, Rius J, Badimon L. A nuclear orphan receptor 385
 (NOR-1) identified in human atherosclerotic plaques is expressed by 386
 activated monocytes and endothelial cells. *J Submicrosc Cytol Pathol* 387
 2000;32:357. Abstract. 388
 [16] Liu D, Jia H, Holmes DI, Stannard A, Zachary I. Vascular en- 389
 dothelial growth factor-regulated gene expression in endothelial cells: 390
 KDR-mediated induction of Egr3 and the related nuclear receptors 391
 Nur77, Nurr1, and Nor1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23: 392
 2002–7. 393
 [17] Martínez-González J, Raposo B, Rodríguez C, Badimon L. 3- 394
 Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibition prevents 395
 endothelial NO synthase downregulation by atherogenic levels of 396
 native LDL. *Arterioscler Tromb Vasc Biol* 2001;21:804–9. 397
 [18] Martínez-González J, Viñals M, Vidal F, Llorente-Cortés V, Badimon 398
 L. Mevalonate deprivation impairs IGF-1/Insulin signalling in human 399
 vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 1997;135:213–23. 400
 401

- 402 [19] Mayo LD, Kessler KM, Pincheira R, Warren RS, Donner DB. Vas- 425
403 cular endothelial cell growth factor activates CRE-binding protein by 426
404 signaling through the KDR receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem* 427
405 2001;276:25184–9. 428
- 406 [20] Ohkubo T, Ohkura N, Maruyama K, et al. Early induction of the 429
407 orphan nuclear receptor NOR-1 during cell death of the human breast 430
408 cancer cell line MCF-7. *Mol Cell Endocrinol* 2000;162:151–6. 431
- 409 [21] Lowe HC, Fahmy RG, Kavurma MM, et al. Catalytic oligodeoxynu- 432
410 cleotides define a key regulatory role for early growth response 433
411 factor-1 in the porcine model of coronary in-stent restenosis. *Cir* 434
412 *Res* 2001;89:670–7. 435
- 413 [22] Clauss M, Weich H, Breier G, et al. The vascular endothelial growth 436
414 factor receptor Flt-1 mediates biological activities. Implications for 437
415 a functional role of placenta growth factor in monocyte activation 438
416 and chemotaxis. *J Biol Chem* 1996;271:17629–34. 439
- 417 [23] Martinez-Gonzalez J, Badimon L. The NR4A subfamily of nuclear 440
418 receptors: new early genes regulated by growth factors in vascular 441
419 cells. *Cardiovasc Res* 2005;65:609–18. 442
- 420 [24] Ohkura N, Hijikuro M, Yamamoto A, Miki K. Molecular cloning 443
421 of a novel thyroid/steroid receptor superfamily gene from cultured 444
422 rat neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;205:1959– 445
423 65. 446
- 424 [25] Wansa KD, Harris JM, Yan G, Ordentlich P, Muscat GE. The AF- 447
425 1 domain of the orphan nuclear receptor NOR-1 mediates trans- 448
426 activation, coactivator recruitment, and activation by the purine anti-
427 metabolite 6-mercaptopurine. *J Biol Chem* 2003;278:24776–90.
- [26] Wang Z, Benoit G, Liu J, et al. Structure and function of Nurr1 427
428 identifies a class of ligand-independent nuclear receptors. *Nature* 428
429 2003;423:555–60. 429
- [27] Baker KD, Shewchuk LM, Kozlova T, et al. The *Drosophila* orphan 430
431 nuclear receptor DHR38 mediates an atypical ecdysteroid signaling 431
432 pathway. *Cell* 2003;113:731–42. 432
- [28] Jia H, Bagherzadeh A, Bicknell R, et al. Vascular endothelial growth 433
434 factor (VEGF)-D and VEGF-A differentially regulate KDR-mediated 434
435 signaling and biological function in vascular endothelial cells. *J Biol* 435
436 *Chem* 2004;279:36148–57. 436
- [29] Perlmann T, Jansson L. A novel pathway for vitamin A signaling 437
438 mediated by RXR heterodimerization with NGFI-B and Nurr1. *Genes* 438
439 *Dev* 1995;9:769–82. 439
- [30] Zetterstrom RH, Solomin L, Mitsiadis T, Olson L, Perlmann T. 440
441 Retinoid X receptor heterodimerization and developmental expres- 441
442 sion distinguish the orphan nuclear receptors NGFI-B, Nurr1, and 442
443 Nor1. *Mol Endocrinol* 1996;10:1656–66. 443
- [31] Arkenbout EK, van Bragt M, Eldering E, et al. TR3 orphan receptor 444
445 is expressed in vascular endothelial cells and mediates cell cycle 445
446 arrest. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1535–40. 446
- [32] Jain RK. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept 447
448 in antiangiogenic therapy. *Science* 2005;307:58–62. 448

UNCORRECTED PROOF

Adendum al artículo 3: “*NOR-1 is Involved in VEGF-induced Endothelial Cell Growth*”.

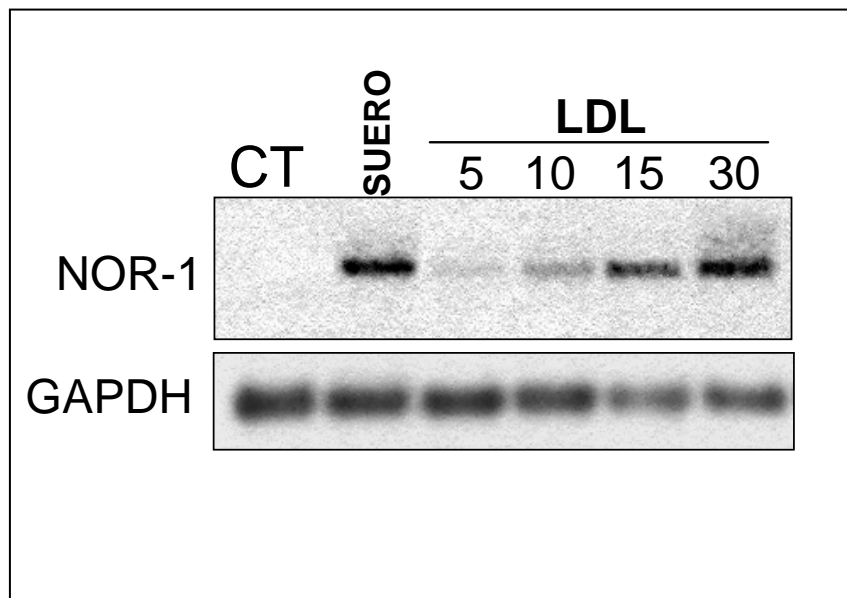


Figura 2 Inducción de la expresión de NOR-1 por LDL en HUVEC
Figura que muestra la expresión de NOR-1 en HUVEC inducidas con diferentes concentraciones de LDL durante 1 hora. El RNA de estas células fue analizado por RT-PCR. Las concentraciones de LDL utilizadas fueron 5, 10, 15 y 30 mg de proteína/dl. Las LDL inducen la expresión de NOR-1 en HUVEC.

IV. Resumen de resultados

Resumen de resultados:

ARTÍCULO 1: *“Involvement of Neuron-derived Orphan Receptor-1 (NOR-1) in LDL-induced mitogenic stimulus in vascular smooth muscle cells: role of CREB”.*

Las LDL inducen la expresión de NOR-1 en CML.

La expresión de NOR-1 es inducida por LDL en CML de manera dependiente de la dosis. Concentraciones altas de VLDL y LDLox (10 mg/dl) inducen la expresión de NOR-1, pero de una manera claramente inferior al efecto producido por las LDL (figura 1A). Las LDL inducen la expresión de NOR-1 de forma transitoria, produciendo una máxima inducción 1 hora después del estímulo, y disminuyendo a niveles basales a las 8 horas (figura 1B).

Oligonucleótidos antisentido contra NOR-1 inhiben la síntesis de DNA inducida por LDL.

La expresión de NOR-1 inducida por LDL en CML, es inhibida por oligonucleótidos antisentido contra NOR-1 (figura 2 A). Estos mismos oligonucleótidos, inhiben la síntesis de DNA inducida por LDL en estas células, a niveles similares que los producidos por un oligonucleótido antisentido contra *c-fos* (figura 2 B).

Vías de señalización involucradas en la inducción de NOR-1.

Para estudiar las vías de señalización involucradas en la inducción de NOR-1 por LDL, se utilizaron diferentes inhibidores de estas vías. La inducción de la expresión de NOR-1 es dependiente de la activación de proteínas $G_{i/o}$ (inhibidas por toxina pertussis), del aumento de calcio citosólico (inhibido por un quelante de calcio [BAPTA]), y de la activación de PKC (inhibida por GF-109203X) (figura 3A). También es dependiente de la activación de las vías p44/p42 MAPK y p38 MAPK (inhibidas por PD98059 y SB203580 respectivamente). La utilización del H-89, un inhibidor de la PKA, también inhibe el efecto de las LDL (figura 3B).

Las LDL inducen fosforilación de CREB.

Las LDL inducen una rápida y transitoria fosforilación de CREB en Ser¹³³ (figura 4A). Este efecto de las LDL es inhibido en presencia de BAPTA y GF-109203X (figura 4B).

CREB se une a los CRE presentes en promotor de NOR-1.

En experimentos de retardo en gel, los extractos nucleares de CML, se unen a tres sitios CRE presentes en el promotor de NOR-1. La inducción de la fosforilación de CREB en estas células con LDL, no varió la unión los elementos de respuesta (figura I aprt. online).

Los elementos CRE regulan la inducción de NOR-1 por LDL.

Para estudiar el papel de los elementos CRE presentes en el promotor de NOR-1, CML de rata fueron transfectadas con un fragmento del promotor de NOR-1 unido a luciferasa como gen reportero y se analizó la actividad de este. Igual que en CML humanas, en estas células las LDL inducen la expresión de NOR-1. Este efecto es inhibido por un quelante de calcio (BAPTA-AM) y un inhibidor de la PKC (GF-109203X) (figura II aprt. online). Las LDL inducen la actividad del promotor de NOR-1, mientras que BAPTA-AM y GH-109203X inhiben este efecto. La actividad del promotor de NOR-1 también fue inhibida cuando las células se contranfectaban con un dominante negativo de CREB o cuando se eliminaban los sitios CRE del promotor de NOR-1 por mutagénesis dirigida (figura 5B).

Adendum al artículo 1:

NOR-1 es inducido por S1P en CML.

Para estudiar el papel de diferentes componentes de las LDL sobre la expresión de NOR-1, se incubaron CML con S1P y LPA a diferentes concentraciones, y se analizó el RNA de estas células por RT-PCR. La expresión de NOR-1 aumento de manera dependiente de la dosis con S1P, mientras que no se observó ninguna variación de la expresión de NOR-1 en células inducidas con LPA.

ARTICULO 2: “*Simvastatin inhibits NOR-1 expression induced by hyperlipemia by interfering with CREB activation*”

Las estatinas inhiben la expresión de NOR-1 en CML *in vitro* y en la pared arterial de cerdos hiperlipémicos.

Las estatinas (atorvastatina 10 μ M y simvastatina a concentraciones crecientes) inhiben la expresión de NOR-1 en CML inducidas con LDL (figura 1A). *In vivo* la expresión de NOR-1 fue inducida en pared vascular de cerdos sometidos a una dieta rica en colesterol, e inhibida cuando estos animales eran tratados con simvastatina.(Figura 1B).

Las proteínas geranilgeraniladas son clave en la inducción por LDL de la síntesis de DNA y de la expresión de NOR-1 en CML.

La inducción de síntesis de DNA por LDL es inhibida por estatinas y revertida por mevalonato y geranilgeraniol, pero no por farnesol (figura 2A). Lo mismo ocurre en la inducción de la expresión de NOR-1 por LDL (figura 2B y 2C).

La vía de RhoA/ROCK está involucrada en la sobreexpresión de NOR-1 inducida por LDL.

La simvastatina inhibe la activación de RhoA porque inhibe su isoprenilación y translocación a membrana (figura 3A). Para estudiar si RhoA está involucrado en la inducción de NOR-1 por LDL, se utilizaron diferentes inhibidores de la vía RhoA/ROCK. Toxina B (un inhibidor de proteínas Rho), C3 (un inhibidor de RhoA) e Y-27632 (un inhibidor de ROCK), inhiben la expresión de NOR-1 inducida por LDL (figura 3B y 3C). En experimentos con un gen reportero, la simvastatina inhibe la actividad del promotor de NOR-1 inducida por LDL. Este efecto es revertido por mevalonato y geranilgeraniol, pero no farnesol. RhoAT19N, un dominante negativo de RhoA, también inhibe la actividad del promotor de NOR-1 inducida por LDL (figura 4A). Por el contrario, ni la simvastatina ni RhoAT19N producen ningún efecto sobre un promotor mínimo (p410-DHFR-Luc) (figura 4B).

La simvastatina inhibe la fosforilación y la actividad de CREB

CREB es un factor de transcripción que está involucrado en la inducción de la expresión de NOR-1 por LDL. Por ello quisimos estudiar el efecto de la simvastatina sobre la unión de CREB a su elemento de respuesta CRE. Ni la simvastatina ni las LDL afectan la unión de CREB a los elementos CRE del promotor de NOR-1, ni tampoco a los elementos CRE de una secuencia consenso (figura 5A y 5B). Por el contrario, la simvastatina inhibe la fosforilación inducida por LDL de CREB en Ser¹³³. Este efecto es revertido por geranilgeraniol y mevalonato, pero no por farnesol. Un inhibidor de RhoA (exotoxina C3) y un inhibidor de ROCK (Y-27632), también inhiben la fosforilación de CREB en Ser¹³³ inducida por LDL (figura 6A y 6B). En estudios de gen reportero, la simvastatina y RhoAT19N inhiben la actividad inducida por LDL de un promotor básico regulado por cuatro cajas CRE. Además, la simvastatina inhibe la expresión de otro gen, el Smemb, cuyo promotor también está regulado por el factor de transcripción CREB (figura 7B y 7C).

ARTÍCULO 3: “*NOR-1 is Involved in VEGF-induced Endothelial Cell Growth*”.

VEGF induce la expresión de NOR-1 a través de receptores VEGFR-2.

VEGF induce la expresión de NOR-1 en células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC). Esta expresión es dependiente de la concentración de VEGF, y es máxima 1 hora después de la inducción (figura 1A, 1B y 1C).

PIGF (ligando específico para VEGFR-1), no induce la expresión de NOR-1, mientras que un inhibidor de VEGFR-2 (SU5614), reduce la expresión de NOR-1 inducida por VEGF, indicando que VEGFR-2 está involucrado en la actividad de la expresión de NOR-1 por VEGF (figura 2A).

Para estudiar diferentes vías que estuvieran involucradas con la activación de NOR-1 por VEGF en HUVEC, se testaron diferentes inhibidores. Bisindolylmaleimida I (un inhibidor general de PKC) inhibe totalmente la expresión de NOR-1, mientras que BAPTA-AM (un quelante de calcio) o Gö6976 (un inhibidor de proteínas PKC dependientes de calcio), solo inhiben parcialmente la expresión de NOR-1. U0128 (un inhibidor de MEK) y SB203580 (un inhibidor de p38 MAPK) inhiben la expresión de NOR-1 (figura 2B).

VEGF induce la expresión de NOR-1 a través de la activación de CREB.

VEGF induce la actividad de CREB por fosforilación en Ser¹³³. Dicha activación es inhibida totalmente por bisindolylmaleimida I, por U0128, y por SB203580, mientras que es inhibida parcialmente por BAPTA-AM y por Gö6976 (figura 3A).

La mutación de las diferentes cajas CRE del promotor de NOR-1, al igual que la contranfección con el dominante negativo de CREB, inhibe la actividad del promotor de NOR-1 inducida por VEGF en células endoteliales (figura 3C).

NOR-1 está involucrado en la regulación de la síntesis de DNA inducida por VEGF

En presencia de oligonucleótidos anti NOR-1, la síntesis de DNA inducida por VEGF en HUVEC, fue inhibida (figura 4).

NOR-1 regula la progresión del ciclo celular en células endoteliales.

Se analizó por citometría de flujo el efecto de oligonucleotidos antisentido contra NOR-1 en la progresión del ciclo celular de HUVEC. VEGF incrementa el número de células en fase S, mientras que disminuye el número de células que se encuentra en fase G₀/G₁. Oligonucleótidos antisentido anti NOR-1 inhibe este efecto del VEGF sobre la progresión del ciclo celular (figura 5A y B).

NOR-1 modula el crecimiento de las células endoteliales, en un modelo de reparación de herida *in vitro*

El oligonucleótido antisentido contra NOR-1 inhibió el crecimiento celular inducido por VEGF en un modelo *in vitro* de reparación de una herida (figura 6A y B).

Adendum al artículo 3:

Las LDL inducen la expresión de NOR-1 en HUVEC.

Para estudiar el efecto de las LDL sobre la expresión de NOR-1 en células endoteliales, se incubaron HUVEC con diferentes concentraciones de LDL durante 1 hora. Las LDL inducen la expresión de NOR-1 de una forma dependiente de la dosis en HUVEC.

V. Discusión

Importancia de NOR-1 en la proliferación de las CML inducida por LDL.

La activación de las CML es clave en el desarrollo y evolución de la placa aterosclerótica (*Lusis AJ. 2000*) y el papel exacto que juegan las CML en la aterosclerosis sigue siendo objeto de debate (*Dzau VJ. et al. 2002*). En las lesiones tempranas las CML contribuyen al desarrollo del ateroma a través de la producción de moléculas proinflamatorias y a la síntesis de matriz extracelular que participa del engrosamiento de la pared y favorece la retención de las lipoproteínas en el subendotelio. Sin embargo, las CML también son las encargadas de generar una cubierta fibrosa rica en matriz extracelular que cubre el núcleo lipídico y da estabilidad a la placa. Por esta razón se cree que la activación CML tendrían un carácter proaterogénico al inicio de la lesión, mientras que en estados tardíos, las CML jugarían un papel protector (*Dzau VJ. et al. 2002*). En este contexto, los genes implicados en la activación de las CML pueden ser nuevas dianas farmacológicas para el tratamiento de la enfermedad.

NOR-1 es un receptor nuclear huérfano, miembro de la familia NGFI-B, que está involucrado en la proliferación de diferentes tipos de células incluyendo las CML (*Hedvat CV, Irving SG. 1995; Borghaei RC. et al. 1998; Pirih FQ. et al. 2003*). Se sobreexpresa *in vivo* por dilatación vascular con balón (angioplastia) (*Martinez-Gonzalez J. et al 2003*), y también en lesiones ateroscleróticas de pacientes con cardiopatía isquémica (*Arkenbout EK. et al. 2002*).

Uno de los principales factores de riesgo aterosclerótico es la hipercolesterolemia (*Lusis AJ. 2000*). Concentraciones elevadas de LDL plasmáticas, favorecen su infiltración en la pared donde participan activamente en diferentes procesos proaterogénicos. Entre estos procesos se encuentra la activación de las CML. En este caso las LDL se comportan como “factores de crecimiento” y actúan a través de receptores independientes del LDLR (*Gouni-Berthold I, Sachinidis A. 2004*). Como mitógenos, las LDL aumentan las concentraciones intracelulares de calcio (*Sachinidis A. et al. 1990*); estimulan el metabolismo de fosfoinositoides y la translocación a la membrana de la PKC (*Scott-Burden T. et al. 1989*); activan la vía de proteínas ERK y p38 MAPK

(*Sachinidis A. et al. 1997; Gouni-Berthold I, Sachinidis A. 2004*) y regulan la actividad de factores de transcripción como AP-1 (*Zhu Y. et al. 1998*). La activación de estas vías de señalización se produce a través de GPCRs acoplados a proteínas G sensibles a toxinas pertusis (*Sachinidis A. et al 1997; Gouni-Berthold I, Sachinidis A. 2004*). Las LDL podrían activar estos receptores mediante alguno de sus componentes como la S1P, que interactúa con receptores GPCR de la familia *Edg* (*Sanchez T, Hla T. 2004*) e induce proliferación de las CML (*Lockman K. et al 2004*).

Las LDL inducen la expresión de NOR-1 a través de una compleja red de vías de transducción de señales que involucra a proteínas G sensibles a toxina pertusis, y en la que se produce movilización de calcio, activación de PKA, de PKC y de vías de MAPK (p44/p42 y p38). Todas ellas son vías activadas en la migración y proliferación celular. La participación de proteínas G sugiere que la activación de la transcripción de NOR-1 por LDL es independiente del LDLR y que está relacionada con GPCRs. De acuerdo con estos datos, nuestros resultados muestran la inducción de NOR-1 por S1P en CML, aunque a niveles inferiores que los producidos por las LDL. Esto sugiere que la inducción de la expresión de NOR-1 por LDL, podría ser el resultado de la activación de diferentes vías de señalización en la que estarían involucrados diversos componentes de las LDL, cuyo efecto aditivo o sinérgico, produciría la inducción de NOR-1 observado al tratar con LDL nativas. La activación de la expresión de NOR-1 es dependiente de la activación de CREB, a su vez activado por S1P en CML (*Han JS et al 2003*). Nuestros resultados indican que CREB está unido constitutivamente a los elementos de respuesta presentes en el promotor de NOR-1 y que al activarse por fosforilación de Ser¹³³ promueve la transcripción de NOR-1. La activación de CREB por fosforilación en Ser¹³³ es dependiente de diferentes quinasas como PKA o la p38 MAPK (*Soderling TR. 1999; Nemeth ZH. et al. 2003*), que también son activadas en la inducción de NOR-1 por LDL.

La inducción de hipercolesterolemia en un modelo porcino mediante dieta rica en colesterol (2% colesterol, 1% ácido cólico, y 20% grasa de ternera), produce lesiones ateroscleróticas en la pared vascular de estos animales (*Rodriguez C. et al. 2002*). Nosotros hemos observado que en las lesiones tempranas de nuestro modelo porcino se produce un aumento de la

expresión de NOR-1. Este tipo de lesiones se caracterizan por la presencia de numerosas CML proliferando y migrando a la íntima. NOR-1 está involucrado en la proliferación y en la migración de las CML inducidas con suero (*Martinez-Gonzalez J. et al. 2003*). La inhibición de la expresión de NOR-1 en CML utilizando oligonucleótidos antisentido, reduce la proliferación celular inducida por LDL, de manera similar a oligonucleótidos contra un gen claramente involucrado en la activación celular como es *c-fos* (*Martinez-Gonzalez. et al 1997*). Estos resultados indican el papel importante de NOR-1 en la proliferación de CML. La utilización de NOR-1 como diana terapéutica podría evitar la migración y proliferación de las CML y por tanto el desarrollo de la lesión.

La inhibición de NOR-1 podría participar de los efectos pleiotrópicos de las estatinas.

Las estatinas son fármacos hipolipemiantes que presentan grandes beneficios en el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares (*Estudio Group SSSS*) y que reducen los niveles plasmáticos de LDL gracias al efecto inhibitorio que ejercen sobre la HMG-CoA reductasa, enzima clave en la biosíntesis de colesterol e isoprenoides (*Goldstein JL, Brown MS. 1990*). A pesar de que las estatinas actúan principalmente como hipolipemiantes, actualmente se han descrito diferentes efectos de estos medicamentos independientes de los niveles plasmáticos de LDL. Estos efectos se denominan pleiotrópicos y contribuyen al resultado clínico beneficioso de estos fármacos. La estabilidad de la placa, el descenso del estrés oxidativo y de la inflamación, o la inhibición de la respuesta trombogénica, son algunos de los efectos pleiotrópicos de las estatinas (*Liao JK, Laufs U. 2005*). Una de las causas por la que se producen estos efectos, es la inhibición de la modificación postraduccional de proteínas isopreniladas. La falta de isoprenoides como consecuencia de la inhibición de la vía de mevalonato, produciría la inactivación de muchas proteínas, que necesitan ser modificadas por isoprenilación. Estas proteínas, sobretodo las pertenecientes a la familia de proteínas pequeñas que unen GTP, están involucradas en diversos procesos celulares y en la regulación de la expresión de diferentes genes (*Etienne-Manneville S, Hall A. 2002*).

Tal como he comentado, la hipercolesterolemia aumenta la expresión de NOR-1 en la pared vascular en un modelo porcino. Cuando estos animales fueron tratados con estatinas la expresión de NOR-1 en pared vascular se redujo de manera significativa respecto a los animales no tratados. Los niveles de colesterol plasmático de los dos grupos de animales (tratados o no tratados con simvastatina) no presentan diferencias significativas. Estos resultados sugieren que NOR-1 se regula en pared arterial por la hipercolesterolemia y que el efecto inhibitorio de las estatinas sobre la expresión de NOR-1 es independiente de los niveles plasmáticos de LDL.

En cultivos de CML, las estatinas inhiben la expresión de NOR-1 y la proliferación de las CML inducidas con LDL. El mevalonato, sustrato de la HMG-CoA reductasa, revierte el efecto de las estatinas en ambos casos.

Las proteínas de la superfamilia Ras son modificadas por isoprenoides para ser activas. Por lo general las proteínas que necesitan ser modificadas por farnesol, pertenecen a la familia de proteínas Ras, mientras que las que necesitan ser modificadas por un geranilgeraniol, pertenecen a la familia de proteínas Rho. En nuestros experimentos, la adición de farnesol no afectaba el efecto inhibitorio de la estatina sobre la expresión de NOR-1 y la proliferación de CML. Por el contrario, al adicionar geranilgeraniol este efecto era revertido, prácticamente en su totalidad. Este resultado indica que al menos una proteína geranilgeranilada juega un papel importante en la inducción por LDL de la expresión de NOR-1 y en la proliferación de las CML.

Debido a que NOR-1 regula la proliferación celular de las CML inducida por LDL, y que éste se regula por estatinas tanto *in vivo* como *in vitro*, la inhibición de su expresión podría estar involucrada en el efecto antiaterogénico de las estatinas sobre la lesión aterosclerótica.

Papel de la vía Rho/ROCK en la inducción de NOR-1 por LDL.

RhoA es una proteína geranilgeranilada que participa de diversos procesos celulares y que es capaz de regular la expresión de genes a través de la modulación de diferentes vías de señalización. En CML, RhoA regula procesos como la migración inducida por la uroquinasa (Kian I. et al. 2003), la proliferación a través de la inhibición de p27^{Kip1} (Laufs U. et al. 1999), y la

diferenciación, donde RhoA es inducido por S1P a través de receptores GPCRs y regula la actividad de cofactores de SRF induciendo diferenciación y proliferación celular (*Lockman K. et al. 2004*). RhoA es activado tanto por receptores con actividad tirosina-quinasa (*Zeng H. et al 2002*), como por GPCRs a través de proteínas G que activan a distintas GEF (*Lutz S et al. 2005*). Para activarse RhoA necesita estar anclada en membrana plasmática donde intercambiará GDP por GTP y activará diferentes efectores como ROCK. La translocación a membrana se produce tras la modificación postraduccional por geranilgeranilización. Las LDL inducen la translocación a membrana y actividad de RhoA (*Zhu Y. et al. 2003*). Por contra, las estatinas, inhiben la síntesis de isoprenoides y la modificación postraduccional de RhoA, inhibiendo la actividad de RhoA, y las vías de señalización que regula.

Nuestros resultados muestran que la incubación de las células con simvastatina, a concentraciones que inhiben la proliferación de las CML y la translocación de RhoA a membrana, inhibe la expresión de NOR-1 inducida por las LDL. La inhibición directa de RhoA mediante un inhibidor de proteínas de la familia Rho como es la toxina B (*Just I. et al. 1995*) o la utilización de un inhibidor específico de RhoA, como exotoxina C3 (*Aktorics K. et al. 2004*), produce también la disminución de la expresión de NOR-1 inducida por LDL. De la misma forma, el inhibidor de ROCK, Y-27632 (*Shimokawa H. 2002*), inhibe la expresión de NOR-1. Estos resultados indican que la vía de RhoA/ROCK está involucrada en la activación de NOR-1 por LDL. En experimentos de transfección transitoria, el promotor de NOR-1 unido a un gen reportero (luciferasa), es activado por LDL. Esta actividad es inhibida por las estatinas, la exotoxina C3, la toxina B y el Y-27632, efecto revertido en el caso de las estatinas por el geranilgeraniol y el mevalonato, pero no por el farnesol. La cotransfección con un dominante negativo de RhoA, también inhibe la actividad del promotor de NOR-1 inducida por LDL. Estos resultados corroboran los obtenidos en los experimentos de análisis de expresión, involucrando la vía de la RhoA/ROCK en la inducción de la transcripción de NOR-1 inducida por LDL.

Regulación de la actividad de CREB por estatinas.

Las LDL inducen la expresión de NOR-1 a través de un mecanismo dependiente de la activación de CREB. Por ello estudiamos el efecto que producen las estatinas en la activación de CREB. Nuestros resultados, muestran que ni las LDL, ni la simvastatina, afectan a la unión de CREB a las secuencias CRE que se localizan en el promotor de NOR-1 o las localizadas en un oligonucleótido con secuencias CRE consenso. Esto indica que la regulación del promotor NOR-1 por LDL y simvastatina no es mediante una modulación de la unión de CREB a dicho promotor. Este resultado concuerda con trabajos anteriores que describen que CREB permanece unido a los promotores que regula constitutivamente y solo actúa cuando se activa por fosforilación en la Ser¹³³ (Hagiwara M. et al. 1993). Nosotros hemos observado que la simvastatina reduce los niveles de fosforilación en Ser¹³³ de CREB inducida por LDL, efecto revertido con geranilgeraniol y mevalonato, pero no con farnesol, involucrando a proteínas geranilgeraniladas en la activación de CREB inducida con LDL. Además inhibidores de la vía RhoA/ROCK (Y-27632 y Exotoxina C3) producen una inhibición similar a la de la simvastatina sobre la activación de CREB.

También hemos observado que el gen de la forma embrionaria de la cadena pesada de la miosina (*the embryonic form of myosin heavy chain*, SMemb), cuyo promotor es inducido por LDL y está regulado por elementos CRE (Sekiguchi K. et al 2001), es inhibido en presencia de simvastatina. En concordancia con estos resultados, en estudios de transfección transitoria, un promotor bajo el control de cuatro cajas CRE, es inducido por LDL, efecto que se ve inhibido por la preincubación con simvastatina y la cotransfección con un dominante negativo de RhoA. Todos estos resultados involucran a la vía RhoA/ROCK en la activación de CREB inducida por LDL.

Vía de señalización LDL-RhoA/ROCK-CREB

Componentes de las LDL como el LPA o la S1P, modulan respuestas celulares mediadas por proteínas Rho a través de receptores GPCRs (Radeff-Huang J. et al. 2004). Por ejemplo, se ha descrito que la S1P activa la transcripción de la proteína 61 rica en cisteína (*Cysteine-rich protein 61*, Cyr61) a través de un

mecanismo dependiente de la vías RhoA/ROCK, p38 MAPK y de la activación de CREB, pero independiente de la actividad de PKA y PKC. También se ha descrito que se reducen los niveles de la fosforilación de CREB en Ser¹³³, al inhibir la vía RhoA/ROCK (*Han JS et al 2003*).

La activación de la vía RhoA/ROCK, el aumento de calcio intracelular y la activación de PKA, de PKC y de las vías ERK y p38 MAPK, son necesarios para la inducción NOR-1 y para la activación de CREB por fosforilación en la Ser¹³³ por LDL. Según trabajos anteriores, podría suponerse que los distintos componentes de las LDL se unen a los GPCRs (*Gouni-Berthold I, Sachinidis A. 2004*), que activarían la vía RhoA/ROCK y está a la vía de proteínas p38 MAPK (*Senokuchi T. et al 2005*), que desencadena la fosforilación de CREB en Ser¹³³. Pero en la activación de NOR-1 por LDL también están involucradas PKA, PKC y proteínas ERK. Esto es explicable si consideramos que las LDL están formadas por diferentes componentes, que pueden activar otras vías y actuar de forma sinérgica para producir una respuesta celular única. De acuerdo con esto, existen receptores GPCRs que activan proteínas Rho y éstas interactúan e incrementan la actividad de la PLC (*Seifert JP. et al. 2004*), causando un aumento de calcio intracelular. Las Proteínas Rho también pueden activar a la PKC (*Slater SJ. et al. 2001, Li J. et al. 2004; Nozu F. et al 1999*), induciendo de esta forma las vías de p38 MAPK y ERK1/2.

La activación de la transcripción de NOR-1 por LDL, es dependiente de la activación de diferentes vías de señalización, que se integran a nivel de CREB. Nuestros resultados muestran por primera vez, que las estatinas son capaces de inhibir la actividad de CREB y regular de esta forma la transcripción de distintos genes involucrados en aterosclerosis.

Papel de NOR-1 en CE (células endoteliales) inducidas con VEGF.

El VEGF es una citoquina que estimula la migración y proliferación de CE, induce angiogénesis y permeabilidad vascular, y es clave en patologías como la aterosclerosis o el cáncer (*Verheul HM, Pinedo HM. 2003*).

Las LDL aumentan la expresión de VEGF y VEGFR-2 en CE (*Rodriguez JA. et al. 2005*), a la vez que NOR-1 también es inducido por VEGF en estas

células (*Martinez-Gonzalez J. et al 2000; Liu D. et al 2003*). En condiciones de hiperlipemia, la inducción de NOR-1 en CE podría estar activada, no solo por las LDL (*Martinez-Gonzalez J. et al 2000*), sino también por el aumento de VEGF y VEGFR-2 que estas lipoproteínas inducen (*Rodriguez JA. et al. 2005*). Dado el papel clave que el VEGF juega en la biología de las CE, quisimos analizar los mecanismos implicados en la activación de la expresión de NOR-1 por VEGF. Por ello decidimos estudiar a través de que receptor, VEGF induce NOR-1, y que vías de señalización participan de esta inducción.

Nuestros resultados muestran que la inducción de NOR-1 es dependiente del receptor VEGFR-2. VEGFR-2 está involucrado en diferentes procesos biológico como proliferación y migración, inducidos por VEGF en CE (*Zachary I. 2003; Clauss M. et al. 1996*). VEGFR-2 puede activar a proteínas G heterotriméricas y proteína RhoA (*Zeng H et al 2002*).

La vías de señalización que participan de la inducción de NOR-1 en CE inducidas con VEGF, son similares a las que participan en las CML: aumentando los niveles de calcio citosólico, la PKC, y las vías de ERK y p38 MAPK, aunque en células endoteliales tanto el aumento de calcio intracelular, como PKC parece que no juegan un papel tan importante como en CML. VEGF también induce la actividad de CREB, siendo necesaria su fosforilación en Ser¹³³ para activar la transcripción del promotor de NOR-1. La actividad de CREB y la transcripción de NOR-1 se inhiben al bloquear cualquiera de las vías mencionadas anteriormente. En estudios de transfección transitoria, hemos demostrado que VEGF induce la actividad del promotor de NOR-1 de una manera dependiente de CREB. Así pues NOR-1 es regulado por diferentes vías de señalización inducidas por VEGF a través de VEGFR-2, que convergen en la activación de CREB.

La proliferación y migración de las CE son importantes para el desarrollo de la angiogénesis. La angiogénesis es la formación de nuevos vasos sanguíneos, y juega un papel importante durante la embriogénesis, en el remodelado vascular en adultos, y en diversos desordenes patológicos como son la aterosclerosis y el desarrollo de tumores (*Costa C. et al. 2004; Isner JM. 1999*). En la angiogénesis las CE son activadas por un factor de crecimiento como el VEGF a través de VEGFR-2. Esto induce la migración y proliferación de estas células que forman nuevos vasos (*Isner JM. 1999*). Para estudiar el

papel que NOR-1 juega en CE inducidas con VEGF, se inhibió su expresión con un oligonucleótido antisentido. Nuestros resultados muestran que al inhibir la expresión de NOR-1, se bloquean la síntesis de DNA, la progresión del ciclo celular y la reparación de una lesión en un modelo *in vitro* de CE inducidas con VEGF. Según estos resultados, NOR-1 está involucrado en la proliferación y migración de las CE inducida por VEGF a través de su receptor VEGFR-2 y de una compleja red de vías de señalización que convergen en la activación de CREB por fosforilación en Ser¹³³. NOR-1 podría ser una diana terapéutica para inhibir la angiogénesis.

NOR-1, estatinas y su papel en la aterosclerosis.

La aterosclerosis es una enfermedad multifactorial en la cuál están involucrados numerosos procesos fisiológicos, diferentes órganos y varios tipos celulares. Es por ello que no debe sorprender que diferentes estudios realizados con animales transgénicos y ratones *knock-out*, hayan implicado a más de 100 genes en la enfermedad aterosclerótica (*Lusis et al. 2004*).

Las estatinas son un fármaco con beneficios claramente antiaterogénicos que regula diferentes procesos en la placa aterosclerótica. Las estatinas son capaces de inducir e inhibir genes de las células involucradas en la aterosclerosis, produciendo una respuesta global antiaterogénica (*Liao JK, Laufs U. 2005*). Uno de los genes regulados por las estatinas, tal como indican estos resultados, es NOR-1. NOR-1 es un receptor nuclear huérfano que pertenece a la familia NGFI-B. Está involucrado en la biología vascular regulando procesos de proliferación y migración en CE y CML. Las estatinas regulan la expresión de NOR-1 en CML por un mecanismo dependiente de la vía RhoA/ROCK y de la activación de CREB. Nuestros resultados muestran que parte de los efectos antiaterogénicos de las estatinas podrían estar mediados por la inhibición de la expresión de NOR-1.

VEGF induce proliferación de las CE por un mecanismo dependiente de la expresión de NOR-1 y a través del receptor VEGFR-2. La proliferación de CE es clave en el proceso de angiogénesis que está asociada a enfermedades como la aterosclerosis y el cáncer (*Isner JM. 1999*). Debido al importante papel

que juega en la proliferación de CE, NOR-1 podría ser una nueva diana terapéutica para regular la angiogénesis en éstas enfermedades.

El hecho de que NOR-1 no posea un ligando conocido (y posiblemente no exista), puede dificultar el diseño de un fármaco para regular la actividad transcripcional de este. Por ello, podría ser interesante diseñar moléculas con afinidad para otros dominios de NOR-1, como AF-1, que participen de la regulación de su actividad (*Wansa KD. et al. 2003*).

VI. Conclusiones

Conclusiones

Papel de NOR-1 en la proliferación de CML inducida por LDL.

- Las LDL inducen la proliferación de las CML a través de un mecanismo dependiente de la expresión de NOR-1.

Efecto de las estatinas sobre la proliferación y la expresión de NOR-1 en CML.

- Las estatinas inhiben la proliferación y la expresión de NOR-1 en CML inducidas con LDL
- Las estatinas inhiben en pared arterial la expresión de NOR-1 inducida por hipercolesterolemia en un modelo porcino.

Mecanismos moleculares que intervienen en la regulación de NOR-1 por estatinas en CML.

- Las estatinas inhiben la expresión de NOR-1 en CML inducidas con LDL por bloqueo de la vía RhoA/ROCK, y de la activación de CREB.

Papel de NOR-1 en la proliferación de CE inducidas por VEGF.

- NOR-1 está involucrado en la proliferación y en reparación tisular de las CE inducida por VEGF.

VII. Bibliografía

A

- Ai S, Kuzuya M, Koike T, Asai T, Kanda S, Maeda K, Shibata T, Iguchi A. Rho-Rho kinase is involved in smooth muscle cell migration through myosin light chain phosphorylation-dependent and independent pathways. *Atherosclerosis*. 2001;155:321-327.
- Aktories K, Wilde C, Vogelsang M. Rho-modifying C3-like ADP-ribosyltransferases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 2004;152:1-22. Epub 2004 Sep 15.
- Alen P, Claessens F, Verhoeven G, Rombauts W, Peeters B. The androgen receptor amino-terminal domain plays a key role in p160 coactivator-stimulated gene transcription. *Mol Cell Biol*. 1999;19:6085-6097.
- Allal C, Favre G, Couderc B, Salicio S, Sixou S, Hamilton AD, Sebti SM, Lajoie-Mazenc I, Pradines A. RhoA prenylation is required for promotion of cell growth and transformation and cytoskeleton organization but not for induction of serum response element transcription. *J Biol Chem*. 2000;275:31001-31008.
- Altucci L, Gronemeyer H. Nuclear receptors in cell life and death. *Trends Endocrinol Metab*. 2001;12:460-468.
- Amano M, Fukata Y, Kaibuchi K. Regulation and functions of Rho-associated kinase. *Exp Cell Res*. 2000;261:44-51.
- Aranda A, Pascual A. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev*. 2001;81:1269-1304
- Arkenbout EK, de Waard V, van Bragt M, van Achterberg TA, Grimbergen JM, Pichon B, Pannekoek H, de Vries CJ. Protective function of transcription factor TR3 orphan receptor in atherogenesis: decreased lesion formation in carotid artery ligation model in TR3 transgenic mice. *Circulation*. 2002;106:1530-1535.

B

- Badimon JJ, Fuster V, Badimon L. Coronary atherosclerosis a multifactorial disease. *Circulation*. 1993;87:suplemento II(3-16).
- Badimon L, Badimon JJ, Cohen M, Chesebro JH, Fuster V. Vessel wall-related risk factors in acute vascular events. *Drugs*. 1991;42:1-9.
- Badimon L, Chesebro JH, Badimon JJ. Thrombus formation on ruptured atherosclerotic plaques and rethrombosis on evolving thrombi. *Circulation*. 1992;86:11174-11185.
- Badimon L, Martinez-Gonzalez J, Royo T, Lassila R, Badimon JJ. A sudden increase in plasma epinephrine levels transiently enhances platelet deposition on severely damaged arterial wall--studies in a porcine model. *Thromb Haemost*. 1999;82:1736-1742.
- Badimon L, Martinez-Gonzalez J. Endothelium and vascular protection: an update. *Rev Esp Cardiol*. 2002 ;55:17-26.
- Badimon L, Fuster V, Corti R, Badimon JJ. Coronary thrombosis: local and systemic factors. *Hurst's the heart, 11th Edition*. Eds. Fuster V. Ed. McGraw-Hill, New York, 2004 Chapter 45 pp 1141 – 1151.^[1]
- Badimon L, Fuster V, Badimon JJ. *Interaction of platelet activation and thrombosis. Atherosclerosis and coronary artery disease (Second Edition)*. Eds. Fuster V, Topol EJ, Nabel EG. Ed. Lippincott-RavenPublishers, Philadelphia, USA 2004 Chapter 41 pp 583-597.^[2]
- Baker KD, Shewchuk LM, Kozlova T, Makishima M, Hassell A, Wisely B, Caravella JA, Lambert MH, Reinking JL, Krause H, Thummel CS, Willson TM, Mangelsdorf DJ. The Drosophila orphan nuclear receptor DHR38 mediates an atypical ecdysteroid signaling pathway. *Cell*. 2003;113:731-742.
- Blanco JC, Minucci S, Lu J, Yang XJ, Walker KK, Chen H, Evans RM, Nakatani Y, Ozato K. The histone acetylase PCAF is a nuclear receptor coactivator. *Genes Dev*. 1998;12:1638-1651.

- Boisvert WA. Modulation of atherogenesis by chemokines. *Trends Cardiovasc Med.* 2004 ;14:161-165.
- Borghaei RC, Sinai RS, Mochan E, Pease EA. Induction of mitogen-inducible nuclear orphan receptor by interleukin 1 in human synovial and gingival fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;251:334-338.
- Braunwald E. Shattuck lecture--cardiovascular medicine at the turn of the millennium: triumphs, concerns, and opportunities. *N Engl J Med.* 1997;337:1360-1369.
- Brown M.S., Goldstein J.L. The SREBP Pathway: Regulation of Cholesterol Metabolism by Proteolysis of a Membrane-Bound Transcription Factor *Cell.* 1997; 89: 331–340.

C

- Camera M, Mussoni L, Maderna P, Sironi L, Prati L, Colli S, Bernini F, Corsini A, Tremoli E. Effect of atherogenic lipoproteins on PAI-1 synthesis by endothelial cells. *Cytotechnology.* 1993;11 Suppl 1:S144-146.
- Cannon CP, McCabe CH, Belder R, Breen J, Braunwald E. Design of the Pravastatin or Atorvastatin Evaluation and Infection Therapy (PROVE IT)-TIMI 22 trial. *Am J Cardiol.* 2002;89:860-861.
- Chatterjee VK, Madison LD, Mayo S, Jameson JL. Repression of the human glycoprotein hormone alpha-subunit gene by glucocorticoids: evidence for receptor interactions with limiting transcriptional activators. *Mol Endocrinol.* 1991;5:100-110.
- Chen JD, Evans RM. A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature.* 1995;377:454-457.
- Cheng LE, Chan FK, Cado D, Winoto A. Functional redundancy of the Nur77 and Nor-1 orphan steroid receptors in T-cell apoptosis. *EMBO J.* 1997;16:1865-1875.

- Chou MM, Hou W, Johnson J, Graham LK, Lee MH, Chen CS, Newton AC, Schaffhausen BS, Toker A. Regulation of protein kinase C zeta by PI 3-kinase and PDK-1. *Curr Biol.* 1998;8:1069-1077.
- Chrivia JC, Kwok RP, Lamb N, Hagiwara M, Montminy MR, Goodman RH. Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature.* 1993;365:855-859.
- Clauss M, Weich H, Breier G, Knies U, Rockl W, Waltenberger J, Risau W. The vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 mediates biological activities. Implications for a functional role of placenta growth factor in monocyte activation and chemotaxis. *J Biol Chem.* 1996;271:17629-17634.
- Coleman ML, Sahai EA, Yeo M, Bosch M, Dewar A, Olson MF. Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat. Cell Biol.* 2001;3:339–345.
- Collins RG, Velji R, Guevara NV, Hicks MJ, Chan L, Beaudet AL. P-Selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Exp Med.* 2000;191:189-194).
- Comb M, Birnberg NC, Seasholtz A, Herbert E, Goodman HM. A cyclic AMP- and phorbol ester-inducible DNA element. *Nature.* 1986;323:353-356.
- Costa C, Soares R, Schmitt F. Angiogenesis: now and then. *APMIS.* 2004;112:402-412.

D

- Della Fazia MA, Servillo G, Sassone-Corsi P. Cyclic AMP signalling and cellular proliferation: regulation of CREB and CREM. *FEBS Lett.* 1997;410:22-24.
- DeYoung RA, Baker JC, Cado D, Winoto A. The orphan steroid receptor Nur77 family member Nor-1 is essential for early mouse embryogenesis. *J Biol Chem.* 2003;278:47104-47109.

- Dong ZM, Chapman SM, Brown AA, Frenette PS, Hynes RO, Wagner DD. The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. *J Clin Invest*. 1998;102:145-152.
- Downs JR, Clearfield M, Weis S, Whitney E, Shapiro DR, Beere PA, Langendorfer A, Stein EA, Kruyer W, Gotto AM Jr. Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels: results of AFCAPS/TexCAPS. Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study. *JAMA*. 1998;279:1615-22.
- Dragunow M. CREB and neurodegeneration. *Front Biosci*. 2004;9:100-103.
- Drexler H. Endotelial dysfunction: clinical implication. *Prog Cardiovasc Dis* 1997;4:287-324.
- Dutil EM, Toker A, Newton AC. Regulation of conventional protein kinase C isozymes by phosphoinositide-dependent kinase 1 (PKD-1). *Curr Biol*. 1998;8:1366-1375.
- Dzau VJ, Braun-Dullaeus RC, Sedding DG. Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies. *Nat Med*. 2002;8:1249-1256.

E

- Endo A. The origin of the statins. 2004. *Atheroscler Suppl*. 2004;5:125-130.
- Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature*. 2002;420:629-635.

F

- Fass DM, Butler JE, Goodman RH. Deacetylase activity is required for cAMP activation of a subset of CREB target genes. *J Biol Chem*. 2003;278:43014-43019. Epub 2003 Aug 25.

- Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1). *N Engl J Med.* 1992;326:242-250.
- Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (2). *N Engl J Med.* 1992;326:310-318.

G

- Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 1990;10:527-534
- Gonzalez GA, Montminy MR. Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell.* 1989;59:675-680.
- Gouni-Berthold I, Sachinidis A. Possible non-classic intracellular and molecular mechanisms of LDL cholesterol. *Curr Vasc Pharmacol.* 2004;2:363-70.
- Graupner G, Wills KN, Tzukerman M, Zhang XK, Pfahl M. Dual regulatory role for thyroid-hormone receptors allows control of retinoic-acid receptor activity. *Nature.* 1989;340:653-656.
- Group SSSS. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet.* 1994;344:1383-1389.
- Gustafsson M, Boren J. Mechanism of lipoprotein retention by the extracellular matrix. *Curr Opin Lipidol.* 2004 Oct;15:505-514.

H

- Hagiwara M, Brindle P, Harootunian A, Armstrong R, Rivier J, Vale W, Tsien R, Montminy MR. Coupling of hormonal stimulation and transcription via the cyclic AMP-responsive factor CREB is rate limited by nuclear entry of protein kinase A. *Mol Cell Biol.* 1993;13:4852-4859.
- Han JS, Macarak E, Rosenbloom J, Chung KC, Chaqour B. Regulation of Cyr61/CCN1 gene expression through RhoA GTPase and p38MAPK signaling pathways. *Eur J Biochem.* 2003;270:3408-3421.
- Hass R, Brach M, Gunji H, Kharbanda S, Kufe D. Inhibition of EGR-1 and NF-kappa B gene expression by dexamethasone during phorbol ester-induced human monocytic differentiation. *Biochem Pharmacol.* 1992;44:1569-1576.
- Hedvat CV, Irving SG. The isolation and characterization of MINOR, a novel mitogen-inducible nuclear orphan receptor. *Mol Endocrinol.* 1995;9:1692-1700.
- Hengst L, Reed SI. Translational control of p27Kip1 accumulation during the cell cycle. *Science.* 1996;271:1861-1864.
- Horlein AJ, Naar AM, Heinzl T, Torchia J, Gloss B, Kurokawa R, Ryan A, Kamei Y, Soderstrom M, Glass CK, et al. Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature.* 1995;377:397-404.

I

- Isner JM. Cancer and atherosclerosis: the broad mandate of angiogenesis. *Circulation.* 1999;99:1653-1655.

J

- Just I, Selzer J, Wilm M, von Eichel-Streiber C, Mann M, Aktories K. Glucosylation of Rho proteins by *Clostridium difficile* toxin B. *Nature*. 1995;375:500-503.

K

- Kamei Y, Xu L, Heinzl T, Torchia J, Kurokawa R, Gloss B, Lin SC, Heyman RA, Rose DW, Glass CK, Rosenfeld MG. A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell*. 1996;85:403-414.
- Karin M, Chang L. AP-1--glucocorticoid receptor crosstalk taken to a higher level. *J Endocrinol*. 2001;169:447-451.
- Katsuda S, Kaji T. Atherosclerosis and extracellular matrix *J Atheroscler Thromb*. 2003;10:267-274.
- Kiiian I, Tkachuk N, Haller H, Dumler I. Urokinase-induced migration of human vascular smooth muscle cells requires coupling of the small GTPases RhoA and Rac1 to the Tyk2/PI3-K signalling pathway. *Thromb Haemost*. 2003;89:904-914.
- Kim DN, Lee KT, Scheeme J, Thomas WA. Quantification of intimal cell masses and atherosclerotic lesions in coronary arteries of control and hyperlipidemic swine. *Atherosclerosis* 1984; 52:115-122.
- Ko Y, Totzke G, Seewald S, Schmitz U, Schiermeyer B, Meyer zu Brickwedde MK, Vetter H, Sachinidis A. Native low-density lipoprotein (LDL) induces the expression of the early growth response gene-1 in human umbilical arterial endothelial cells. *Eur J Cell Biol*. 1995;68:306-312.
- Kolluri SK, Bruey-Sedano N, Cao X, Lin B, Lin F, Han YH, Dawson MI, Zhang XK. Mitogenic effect of orphan receptor TR3 and its regulation by MEKK1 in lung cancer cells. *Mol Cell Biol*. 2003;23:8651-67.

- Kopperud R, Krakstad C, Selheim F, Doskeland SO. cAMP effector mechanisms. Novel twists for an 'old' signaling system. *FEBS Lett.* 2003;546:121-126.
- Kornberg RD, Lorch Y. Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell.* 1999;98:285-294.
- Korzus E, Torchia J, Rose DW, Xu L, Kurokawa R, McInerney EM, Mullen TM, Glass CK, Rosenfeld MG. Transcription factor-specific requirements for coactivators and their acetyltransferase functions. *Science.* 1998;279:703-707.

L

- Labelle Y, Zucman J, Stenman G, Kindblom LG, Knight J, Turc-Carel C, Dockhorn-Dworniczak B, Mandahl N, Desmaze C, Peter M, et al. Oncogenic conversion of a novel orphan nuclear receptor by chromosome translocation. *Hum Mol Genet.* 1995;4:2219-2226.
- Lai JM, Wu S, Huang DY, Chang ZF. Cytosolic retention of phosphorylated extracellular signal-regulated kinase and a Rho-associated kinase-mediated signal impair expression of p21(Cip1/Waf1) in phorbol 12-myristate-13-acetate-induced apoptotic cells. *Mol Cell Biol.* 2002;22:7581-7592.
- Lanz RB, McKenna NJ, Onate SA, Albrecht U, Wong J, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. A steroid receptor coactivator, SRA, functions as an RNA and is present in an SRC-1 complex. *Cell.* 1999 ;97:17-27.
- Lasunción MA. Los lípidos en el organismo. Estructura, función y metabolismo de las lipoproteínas. *Arteriosclerosis en atención primaria. Biblioteca básica SEA.* Módulo 1. Cap. I. 7-29. Ed PRESS LINE.S.L.
- Laudet V. Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor. *J Mol Endocrinol.* 1997;19:207-226.
- Laufs U, Liao JK. Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase. *J Biol Chem.* 1998;273:24266-71.

- Laufs U, Marra D, Node K, Liao JK. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors attenuate vascular smooth muscle proliferation by preventing Rho GTPase-induced down-regulation of p27(Kip1). *J Biol Chem.* 1999;274:21926-21931
- Li J, O'Connor KL, Hellmich MR, Greeley GH Jr, Townsend CM Jr, Evers BM. The role of protein kinase D in neurotensin secretion mediated by protein kinase C-alpha/-delta and Rho/Rho kinase. *J Biol Chem.* 2004;279:28466-28474. Epub 2004 Apr 27.
- Liao JK, Laufs U. PLEIOTROPIC EFFECTS OF STATINS. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2005;45:89-118.
- Libby P, Miao P, Ordovas JM, Schaefer EJ. Lipoproteins increase growth of mitogen-stimulated arterial smooth muscle cells. *J Cell Physiol.* 1985;124:128.
- Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002;420:868-874.
- LIPID: Design features and baseline characteristics of the LIPID (Long-Term intervention with Pravastatin in Ischemic Disease) Study: a randomized trial in patients with previous acute myocardial infarction and/or unstable angina pectoris. *Am J Cardiol.* 1995;76:474-479.
- Liu B, Itoh H, Louie O, Kubota K, Kent KC. The signaling protein Rho is necessary for vascular smooth muscle migration and survival but not for proliferation. *Surgery.* 2002;132:317-325.
- Liu D, Jia H, Holmes DI, Stannard A, Zachary I. Vascular endothelial growth factor-regulated gene expression in endothelial cells: KDR-mediated induction of Egr3 and the related nuclear receptors Nur77, Nurr1, and Nor1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:2002-7. Epub 2003 Oct 2.
- Liu HW, Halayko AJ, Fernandes DJ, Harmon GS, McCauley JA, Kocieniewski P, McConville J, Fu Y, Forsythe SM, Kogut P, Bellam S, Dowell M, Churchill J, Lesso H, Kassiri K, Mitchell RW, Hershenson MB, Camoretti-Mercado B, Solway J. The RhoA/Rho kinase pathway regulates nuclear localization of serum response factor. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003;29:39-47. Epub 2003 Jan 10.
- Lockman K, Hinson JS, Medlin MD, Morris D, Taylor JM, Mack CP. Sphingosine 1-phosphate stimulates smooth muscle cell differentiation and

proliferation by activating separate serum response factor co-factors. *J Biol Chem.* 2004;279:42422-42430. Epub 2004 Aug 3.

- Loirand G, Rolli-Derkinderen M, Pacaud P. RhoA and resistance artery remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;288:H1051-1056.
- Lu Q, Hutchins AE, Doyle CM, Lundblad JR, Kwok RP. Acetylation of cAMP-responsive element-binding protein (CREB) by CREB-binding protein enhances CREB-dependent transcription. *Biol Chem.* 2003;278:15727-15734. Epub 2003 Feb 20.
- Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature.* 2000;407:233-241.
- Lusis AJ, Fogelman AM, Fonarow GC. Genetic basis of atherosclerosis: part I: new genes and pathways. *Circulation.* 2004;110:1868-1873.
- Lutz S, Freichel-Blomquist A, Yang Y, Rumenapp U, Jakobs KH, Schmidt M, Wieland T. The guanine nucleotide exchange factor p63RhoGEF, a specific link between Gq/11-coupled receptor signaling and RhoA. *J Biol Chem.*

M

- Ma H, Hong H, Huang SM, Irvine RA, Webb P, Kushner PJ, Coetzee GA, Stallcup MR. Multiple signal input and output domains of the 160-kilodalton nuclear receptor coactivator proteins. *Mol Cell Biol.* 1999;19:6164-6173.
- Madaule P., Axel R. A novel ras-related gene family. *Cell.* 1985; 41:31-40.
- Maira M, Martens C, Philips A, Drouin J. Heterodimerization between members of the Nur subfamily of orphan nuclear receptors as a novel mechanism for gene activation. *Mol Cell Biol.* 1999;19:7549-7557.
- Marinissen MJ, Chiariello M, Tanos T, Bernard O, Narumiya S, Gutkind JS. The small GTP-binding protein RhoA regulates c-jun by a ROCK-JNK signaling axis. *Mol Cell.* 2004;14:29-41.
- Martinez-Gonzalez J, Vinals M, Vidal F, Llorente-Cortes V, Badimon L. Mevalonate deprivation impairs IGF-I/insulin signaling in human vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis.* 1997;135:213-223.

- Martinez-Gonzalez J, Rius J, Badimon L. A nuclear orphan receptor (NOR-1) identified in human atherosclerotic plaques is expressed by activated monocytes and endothelial cells. *J Submicrosc Cytol Pathol* 2000;32:357. Abstract.
- Martinez-Gonzalez J, Raposo B, Rodriguez C, Badimon L. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibition prevents endothelial NO synthase downregulation by atherogenic levels of native LDLs: balance between transcriptional and posttranscriptional regulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:804-809.
- Martinez-Gonzalez J, Rius J, Castello A, Cases-Langhoff C, Badimon L. Neuron-derived orphan receptor-1 (NOR-1) modulates vascular smooth muscle cell proliferation. *Circ Res.* 2003;92:96-103.
- Martinez-Gonzalez J, Badimon L. Reducción de las lesiones vasculares. *Visión integrada del paciente con riesgo cardiovascular. Ed Ergon.* 2003: Cap 4:81-116.
- Martinez-Gonzalez J, Badimon L. The NR4A subfamily of nuclear receptors: new early genes regulated by growth factors in vascular cells. *Cardiovasc Res.* 2005;65:609-618.
- Mayo LD, Kessler KM, Pincheira R, Warren RS, Donner DB. Vascular endothelial cell growth factor activates CRE-binding protein by signaling through the KDR receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem.* 2001;276:25184-9. Epub 2001 May 2.
- Mayr B, Montminy M. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2:599-609.
- Miano JM. Serum response factor: toggling between disparate programs of gene expression. *J Mol Cell Cardiol.* 2003 Jun;35(6):577-93.
- Michael LF, Asahara H, Shulman AI, Kraus WL, Montminy M. The phosphorylation status of a cyclic AMP-responsive activator is modulated via a chromatin-dependent mechanism. *Cell Biol.* 2000;20:1596-1603.
- Michaelson D, Ali W, Chiu VK, Bergo M, Silletti J, Wright L, Young SG, Phillips M. Postprenylation CAAX Processing Is Required for Proper Localization of Ras but Not Rho GTPases. *Mol Biol Cell.* 2005;16:1606-1616. Epub 2005 Jan 19.

- Montminy MR, Sevarino KA, Wagner JA, Mandel G, Goodman RH. Identification of a cyclic-AMP-responsive element within the rat somatostatin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83:6682-6686.
- Moreno PR, Fuster V. New aspects in the pathogenesis of diabetic atherothrombosis. *J Am Coll Cardiol*. 2004;44:2293-300.

N

- Nemeth ZH, Leibovich SJ, Deitch EA, Sperlagh B, Virag L, Vizi ES, Szabo C, Hasko G. Adenosine stimulates CREB activation in macrophages via a p38 MAPK-mediated mechanism. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;312:883-888.
- Neufeld G, Kessler O, Herzog Y. The interaction of Neuropilin-1 and Neuropilin-2 with tyrosine-kinase receptors for VEGF. *Adv Exp Med Biol*. 2002;515:81-90.
- Nicholson AC, Hajjar DP. CD36, oxidized LDL and PPAR gamma: pathological interactions in macrophages and atherosclerosis. *Vascul Pharmacol*. 2004;41:139-146.
- Nissen SE, Tuzcu EM, Schoenhagen P, Brown BG, Ganz P, Vogel RA, Crowe T, Howard G, Cooper CJ, Brodie B, Grines CL, DeMaria AN; REVERSAL Investigators. Effect of intensive compared with moderate lipid-lowering therapy on progression of coronary atherosclerosis: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2004;291:1071-1080.
- Nozu F, Tsunoda Y, Ibitayo AI, Bitar KN, Owyang C. Involvement of RhoA and its interaction with protein kinase C and Src in CCK-stimulated pancreatic acini. *Am J Physiol*. 1999;276:G915-923.

O

- Ohkura N, Hijikuro M, Yamamoto A, Miki K. Molecular cloning of a novel thyroid/steroid receptor superfamily gene from cultured rat neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994;205:1959-1965.
- Ohkura N, Ito M, Tsukada T, Sasaki K, Yamaguchi K, Miki K. Structure, mapping and expression of a human NOR-1 gene, the third member of the Nur77/NGFI-B family. *Biochim Biophys Acta.* 1996;1308:205-214.
- Ohkura N, Ito M, Tsukada T, Sasaki K, Yamaguchi K, Miki K. Alternative splicing generates isoforms of human neuron-derived orphan receptor-1 (NOR-1) mRNA. *Gene.* 1998;211:79-85.
- Ohkura N, Hosono T, Maruyama K, Tsukada T, Yamaguchi K. An isoform of Nurr1 functions as a negative inhibitor of the NGFI-B family signaling. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1444:69-79.
- Olofsson B. Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling. *Cell Signal.* 1999;11:545-554.
- Onate SA, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science.* 1995;270:1354-1357.
- Onate SA, Boonyaratanakornkit V, Spencer TE, Tsai SY, Tsai MJ, Edwards DP, O'Malley BW. The steroid receptor coactivator-1 contains multiple receptor interacting and activation domains that cooperatively enhance the activation function 1 (AF1) and AF2 domains of steroid receptors. *J Biol Chem.* 1998;273:12101-12108.
- Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev.* 2004;84:767-801.

P

- Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev.* 2001;22:153-183.
- Petrova TV, Makinen T, Alitalo K. Signaling via vascular endothelial growth factor receptors. *Exp Cell Res.* 1999;253:117-130.
- Pfitzer G. Invited review: regulation of myosin phosphorylation in smooth muscle. *J Appl Physiol.* 2001;91:497-503.
- Philips A, Lesage S, Gingras R, Maira MH, Gauthier Y, Hugo P, Drouin J. Novel dimeric Nur77 signaling mechanism in endocrine and lymphoid cells. *Mol Cell Biol.* 1997;17:5946-5951.
- Pirih FQ, Nervina JM, Pham L, Aghaloo T, Tetradis S. Parathyroid hormone induces the nuclear orphan receptor NOR-1 in osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Jun;306:144-150.
- Ponnio T, Burton Q, Pereira FA, Wu DK, Conneely OM. The nuclear receptor Nor-1 is essential for proliferation of the semicircular canals of the mouse inner ear. *Mol Cell Biol.* 2002;22:935-945.
- Pritchard KA, Ackerman AW, Ou J, Curtis M, Smalley DM, Fontana JT, Stemerman MB, Sessa WC. Native low-density lipoprotein induces endothelial nitric oxide synthase dysfunction: role of heat shock protein 90 and caveolin-1. *Free Radic Biol Med.* 2002;33:52-62.

R

- Radeff-Huang J, Seasholtz TM, Matteo RG, Brown JH. G protein mediated signaling pathways in lysophospholipid induced cell proliferation and survival. *J Cell Biochem.* 2004;92:949-66.

- Raposo B, Rodriguez C, Martinez-Gonzalez J, Badimon L. High levels of homocysteine inhibit lysyl oxidase (LOX) and downregulate LOX expression in vascular endothelial cells. *Atherosclerosis*. 2004 Nov;177(1):1-8.
- Rasclé A, Johnston JA, Amati B. Deacetylase activity is required for recruitment of the basal transcription machinery and transactivation by STAT5. *Mol Cell Biol*. 2003;23:4162-4173.
- Rasmussen LM, Hansen PR, Ledet T. Homocysteine and the production of collagens, proliferation and apoptosis in human arterial smooth muscle cells. *APMIS*. 2004;112:598-604.
- Rodriguez C, Raposo B, Martinez-Gonzalez J, Casani L, Badimon L. Low density lipoproteins downregulate lysyl oxidase in vascular endothelial cells and the arterial wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:1409-1414.
- Rodriguez JA, Nespereira B, Perez-Illzarbe M, Eguinoa E, Paramo JA. . Vitamins C and E prevent endothelial VEGF and VEGFR-2 overexpression induced by porcine hypercholesterolemic LDL. *Cardiovasc Res*. 2005;65:665-73.
- Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *NEJM*. 1999;340:115-126.
- Rossman KL, Der CJ, Sondek J. Nat Rev Mol Cell Biol. GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6:167-180.

S

- Sachinidis A, Locher R, Mengden T, Vetter W. Low-density lipoprotein elevates intracellular calcium and pH in vascular smooth muscle cells and fibroblasts without mediation of LDL receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990;167:353-359.
- Sachinidis A, Ko Y, Schulte KB, Appenheimer M, Seul C, Meyer zu Brickwedde MK, Nickenig G, Vetter H. Effects of lipoproteins on the

- expression of the early growth response gene-1 and on DNA synthesis in rat vascular smooth muscle cells. *J Hypertens Suppl.* 1993;5:116-117.
- Sachinidis A, Seewald S, Epping P, Seul C, Ko Y, Vetter H. The growth-promoting effect of low-density lipoprotein may be mediated by a pertussis toxin-sensitive mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Pharmacol.* 1997;52:389-397.
 - Sacks FM, Pfeffer MA, Moye LA, Rouleau JL, Rutherford JD, Cole TG, Brown L, Warnica JW, Arnold JM, Wun CC, Davis BR, Braunwald E. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events Trial investigators. *N Engl J Med.* 1996;335:1001-1009.
 - Sanchez T, Hla T. Structural and functional characteristics of S1P receptors. *J Cell Biochem.* 2004 ;92:913-922.
 - Schmitz U, Thommes K, Beier I, Vetter H. Lysophosphatidic acid stimulates p21-activated kinase in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Mar;291:687-91.
 - Schule R, Rangarajan P, Klierer S, Ransone LJ, Bolado J, Yang N, Verma IM, Evans RM. Functional antagonism between oncoprotein c-Jun and the glucocorticoid receptor. *Cell.* 1990;62:1217-1226.
 - Scott-Burden T, Resink TJ, Hahn AW, Baur U, Box RJ, Buhler FR. Induction of growth-related metabolism in human vascular smooth muscle cells by low density lipoprotein. *J Biol Chem.* 1989;264:12582-12589.
 - Seasholtz TM, Majumdar M, Kaplan DD, Brown JH. Rho and Rho kinase mediate thrombin-stimulated vascular smooth muscle cell DNA synthesis and migration. *Circ Res.* 1999;84:1186-1193.
 - Seibold S, Schurle D, Heinloth A, Wolf G, Wagner M, Galle J. Oxidized LDL induces proliferation and hypertrophy in human umbilical vein endothelial cells via regulation of p27Kip1 expression: role of RhoA. *J Am Soc Nephrol.* 2004 Dec;15:3026-3034.
 - Seifert JP, Wing MR, Snyder JT, Gershburg S, Sondek J, Harden TK. RhoA activates purified phospholipase C-epsilon by a guanine nucleotide-dependent mechanism. *J Biol Chem.* 2004;279:47992-47997. Epub 2004 Aug 18.

- Sekiguchi K, Kurabayashi M, Oyama Y, Aihara Y, Tanaka T, Sakamoto H, Hoshino Y, Kanda T, Yokoyama T, Shimomura Y, Iijima H, Ohyama Y, Nagai R. Homeobox protein Hex induces SMemb/nonmuscle myosin heavy chain-B gene expression through the cAMP-responsive element. *Circ Res.* 2001;88:52-8.
- Senokuchi T, Matsumura T, Sakai M, Yano M, Taguchi T, Matsuo T, Sonoda K, Kukidome D, Imoto K, Nishikawa T, Kim-Mitsuyama S, Takuwa Y, Araki E. Statins suppress oxidized low density lipoprotein-induced macrophage proliferation by inactivation of the small G protein-p38 MAPK pathway. *J Biol Chem.* 2005;280:6627-6633. Epub 2004 Dec 17.
- Sever PS, Dahlof B, Poulter NR, Wedel H, Beevers G, Caulfield M, Collins R, Kjeldsen SE, McInnes GT, Mehlsen J, Nieminen M, O'Brien E, Ostergren J. Rationale, design, methods and baseline demography of participants of the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial. ASCOT investigators. *J Hypertens.* 2001;19:1139-1147.
- Shimokawa H. Rho-kinase as a novel therapeutic target in treatment of cardiovascular diseases. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2002;39:319-327.
- Short JM, Wynshaw-Boris A, Short HP, Hanson RW. Characterization of the phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) promoter-regulatory region. II. Identification of cAMP and glucocorticoid regulatory domains. *J Biol Chem.* 1986;26:9721-9726.
- Siess W, Tigyi G. Thrombogenic and atherogenic activities of lysophosphatidic acid. *J Cell Biochem.* 2004;92:1086-1094.
- Slater SJ, Seiz JL, Stagliano BA, Stubbs CD. Interaction of protein kinase C isozymes with Rho GTPases. *Biochemistry.* 2001;40:4437-4445.
- Slyper AH. What Vascular Ultrasound Testing Has Revealed about Pediatric Atherogenesis, and a Potential Clinical Role for Ultrasound in Pediatric Risk Assessment. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89:3089-3095.
- Soderling TR. The Ca-calmodulin-dependent protein kinase cascade. *Trends Biochem Sci.* 1999;24:232-236.
- Stoneman VE, Bennett MR. Role of apoptosis in atherosclerosis and its therapeutic implications. *Clin Sci (Lond).* 2004;107:343-354.

V

- Vidal F, Colome C, Martinez-Gonzalez J, Badimon L. Atherogenic concentrations of native low-density lipoproteins down-regulate nitric-oxide-synthase mRNA and protein levels in endothelial cells. *Eur J Biochem.* 1998;252:378-84.
- Verheul HM, Pinedo HM. Vascular endothelial growth factor and its inhibitors. *Drugs Today (Barc).* 2003;39:81-93.

W

- Walsh DA, Perkins JP, Krebs EG. An adenosine 3',5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle. *J Biol Chem.* 1968;243:3763-3765.
- Wang Z, Benoit G, Liu J, Prasad S, Aarnisalo P, Liu X, Xu H, Walker NP, Perlmann T. Structure and function of Nurr1 identifies a class of ligand-independent nuclear receptors. *Nature.* 2003 ;423:555-560.
- Wansa KD, Harris JM, Muscat GE. The activation function-1 domain of Nur77/NR4A1 mediates trans-activation, cell specificity, and coactivator recruitment. *J Biol Chem.* 2002;277:33001-33011. Epub 2002 Jun 24.
- Wansa KD, Harris JM, Yan G, Ordentlich P, Muscat GE. The AF-1 domain of the orphan nuclear receptor NOR-1 mediates trans-activation, coactivator recruitment, and activation by the purine anti-metabolite 6-mercaptopurine. *J Biol Chem.* 2003;278:24776-24790. Epub 2003 Apr 22.
- Waters DD, Schwartz GG, Olsson AG, Zeiher A, Oliver MF, Ganz P, Ezekowitz M, Chaitman BR, Leslie SJ, Stern T; MIRACL Study Investigators. Effects of atorvastatin on stroke in patients with unstable angina or non-Q-wave myocardial infarction: a Myocardial Ischemia Reduction with Aggressive Cholesterol Lowering (MIRACL) substudy. *Circulation.* 2002;106:1690-1695.

- Waters DD, Guyton JR, Herrington DM, McGowan MP, Wenger NK, Shear C; TNT Steering Committee Members and Investigators. Treating to New Targets (TNT) Study: does lowering low-density lipoprotein cholesterol levels below currently recommended guidelines yield incremental clinical benefit? *Am J Cardiol.* 2004;93:154-158.
- Wennerberg K., Der CJ. Rho-family GTPases:it's not only Rac and Rho (and I like it). *JCS* 2004; 117:1301-1312.
- Wheeler AP, Ridley AJ. Why three Rho proteins? RhoA, RhoB, RhoC, and cell motility. *Exp Cell Res.* 2004; 301:43-49.
- Wilson TE, Fahrner TJ, Johnston M, Milbrandt J. Identification of the DNA binding site for NGFI-B by genetic selection in yeast. *Science.* 1991;252:1296-1300
- Woronicz JD, Calnan B, Ngo V, Winoto A. Requirement for the orphan steroid receptor Nur77 in apoptosis of T-cell hybridomas. *Nature.* 1994;367:277-281.
- WOSCOPS. A coronary primary prevention study of Scottish men aged 45-64 years: trial design. The West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *J Clin Epidemiol.* 1992;45:849-60.

X

- Xu CB, Hansen-Schwartz J, Edvinsson L. Sphingosine signaling and atherogenesis. *Acta Pharmacol Sin.* 2004;25:849-54.
- Xu M, Nie L, Kim SH, Sun XH. STAT5-induced Id-1 transcription involves recruitment of HDAC1 and deacetylation of C/EBPbeta. *EMBO J.* 2003;22:893-904.

Y

- Yang-Yen HF, Chiu R, Karin M. Elevation of AP1 activity during F9 cell differentiation is due to increased c-jun transcription. *New Biol.* 1990;2:351-361.
- Yusuf S, Reddy S, Ounpuu S, Anand S. Global burden of cardiovascular diseases: Part II: variations in cardiovascular disease by specific ethnic groups and geographic regions and prevention strategies. *Circulation.* 2001;104:2855-64.

Z

- Zachary I. VEGF signalling: integration and multi-tasking in endothelial cell biology. *Biochem Soc Trans.* 2003;31:1171-1177.
- Zeng H, Zhao D, Mukhopadhyay D. KDR stimulates endothelial cell migration through heterotrimeric G protein Gq/11-mediated activation of a small GTPase RhoA. *J Biol Chem.* 2002;277:46791-46798. Epub 2002 Sep 19.
- Zetterstrom RH, Solomin L, Jansson L, Hoffer BJ, Olson L, Perlmann T. Dopamine neuron agenesis in Nurr1-deficient mice. *Science.* 1997;276:248-250.
- Zetterstrom RH, Solomin L, Mitsiadis T, Olson L, Perlmann T. Retinoid X receptor heterodimerization and developmental expression distinguish the orphan nuclear receptors NGFI-B, Nurr1, and Nor1. *Mol Endocrinol.* 1996;10:1656-1666.
- Zhong H, SuYang H, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Ghosh S. The transcriptional activity of NF-kappaB is regulated by the IkappaB-associated PKAc subunit through a cyclic AMP-independent mechanism. *Cell.* 1997 May 2;89(3):413-24.

- Zhu Y, Lin JH, Liao HL, Friedli O Jr, Verna L, Marten NW, Straus DS, Stemerman MB. LDL induces transcription factor activator protein-1 in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18:473-1480.
- Zhu Y, Liao H, Wang N, Ma KS, Verna LK, Shyy JY, Chien S, Stemerman MB. LDL-activated p38 in endothelial cells is mediated by Ras. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:1159-1164.
- Zhu Y, Liao HL, Niu XL, Yuan Y, Lin T, Verna L, Stemerman MB. Low density lipoprotein induces eNOS translocation to membrane caveolae: the role of RhoA activation and stress fiber formation. *Biochim Biophys Acta.* 2003;1635:117-126.