



UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE BIOLOGIA

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

***Anàlisi de l'expressió de NOR-1 en les cèl·lules musculars
llises i de la seva implicació en la proliferació cel·lular***

Jordi Rius Capalvo

Barcelona, Febrer de 2004



UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE BIOLOGIA

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

Memòria presentada per En Jordi Rius Capalvo. Programa de Doctorat de Biomedicina (bienni 1999-2001), per a optar al títol de Doctor, sota la direcció de la Dra. Lina Badimon Maestro, Professora de Investigació del CSIC i del Dr. José Martínez González, Investigador de l'Institut de Recerca de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Aquest treball s'ha realitzat al Laboratori d'Investigació Cardiovascular (ICCC-CSIC/Hospital de la Santa Creu i Sant Pau).

Barcelona, Febrer de 2004

Els directors:

Lina Badimon Maestro

José Martínez-González

L'autor:

Jordi Rius Capalvo

Al meu pare

Primer de tot voldria agrair a Lina la confiança dipositada en mi quan en va permetre que m'integres en el seu grup i poguer així començar la meva carrera científica, així com el seu recolzament en tots aquest anys.

També a Pepe el seu ajut i suport en tot aquest temps des de els començaments a la poiatà fins a la redacció d'aquest manuscrit.

A més a més tota aquesta feina no la podria haver fet sense l'ajut i amistat dels meus companys del laboratori. A Javi li vull agrair la seva amistat sincera així com dir-li que ha estat un vertader plaer treballar colze a colze amb ell. A Berta fa molts anys que la conec, primer a la facultat, després col·laborant al departament i finalment fent el doctorat plegats; crec que ha estat una sort haver pogut treballar amb ella ja que si bé és una bona companya de feina, encara ho és més com amiga. Silvia és l'alegria del laboratori i sense la seva simpatia aquesta tesi hauria estat molt més avorrida. Cristina ha estat en aquests anys a més d'un bon exemple a seguir una bona amiga.

A la resta de Sant Pau, que estan o han estat, també els vull agrair la seva paciència i el seu ajut, en especial a Oriol ja que sense ell els transplants no haguessin sigut el mateix. A Clàudia i Anna el fet d'introduir-me al món dels receptors nuclears, a més a més no vull oblidar-me de Marta, Maria i Isabel.

A la gent del CID també els vull donar les gràcies pel seu ajut així com la seva amabilitat sempre que he necessitat qualsevol cosa. Encara que són un munt de gent, crec que he connectat bé amb tothom i per tant espero no oblidar-me a ningú: Sonia, Laura, Gemma, Níia, Xevi, Pablo, Marta, Vicenta, Sandra, Judit, Albert, Vanessa, Mari, Teresa, Silvia, l'altre Judit, Jureck i l'altre Marta i a Maia i a Núria.

A Anna li vull donar les gràcies per la simpatia i la naturalitat que ens ha donat en aquest últims temps així com la seva inestimable ajuda informàtica per fer aquests agraïments. Així com també als veïns del laboratori de baix, Leiv, Santi i Carol

Aquesta tesis també s'ha pogut fer gràcies a la col·laboració d'altres persones, en especial vull agraïr al personal de la Unitat de Trasplantament Cardíac de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau així com al dels Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona.

A Tziar li vull agrair tots els seus consells i idees així com totes les bones estones que hem passat plegats.

A Manu, Alberto, Trota, Cholo i tota la resta de penya sols gràcies per ser amics meus i per a totes les bones estones que hem passat plegats.

Anna, Charo, Marta i Neus, no ser si va ser més difícil fer la carrera o ensortir-se se de totes les aventures que ens hem ficat. Així i tot heu de saber que no podria haver trobat una companyia ni unes amigues millors.

Als meus amics de Biologia, Jordi, Jorge, Noemí, Micky, Sergi, Ramon, Mireia, Chary, Bru, Mar, Nuria, Eva, Marta, Susana, Diana per la seva amistat ja que sense ella no hagués estat el mateix.

Als meus germans Aleix, David i Sergi per aguantar tots els meus "rotllos" sobre la meua tesis, a la meua mare pel seu afecte, comprensió i ajuda sempre que l'he necessitat i al meu pare per ensenyar-me tots els valors que m'han fet com soc.

Abreviatures:

9-cis RA	àcid 9-cis retinòic
AC	adenilat ciclase
AP-1	proteïna activada-1
Apo	apolipoproteïna
bFGF	factor de creixement de fibroblasts bàsic
cAMP	adenosin-3'-5'-monofosfat cíclic
CBP	proteïna d'unió a CREB
CDK	cinasa dependent de ciclina
CML	cèl·lules musculars llises
CRE	element de resposta a cAMP
CREB	proteïna d'unió a CRE
CTE	extensió C-terminal
DAG	diacilglicerol
DBD	domini d'unió al DNA
DNA	àcid desoxirribonucleic
E	glutamat
eNOS	òxid nítric sintasa endotelial
EGF	factor de creixement epidèrmic
ERK	cinasa regulada per estímuls extracel·lulars
FTB	factores de transcripció basals
FXR	receptor del farnesòid X
G	glicina
GPCR	receptor acoblat a proteïnes G
HAT	histona acetiltransferasa
HDL	lipoproteïnes de densitat alta
HRE	element de resposta a hormones
IDL	lipoproteïnes de densitat intermitja
KID	domini induïble per cinases
LBD	domini d'unió al lligand
LDL	lipoproteïnes de densitat baixa
LDLR	receptor de les LDL
LPL	lipoprotein lipasa
LXR	receptor hepàtic X
MAPK	proteïnes cinases activades per mitogens
MKK	MAPK cinasa
MKKK	MKK cinasa
mRNA	RNA missatger
NBRE	element de resposta a NGFI-B
NO	òxid nítric
NOR-1	receptor nuclear orfe derivat de neurones
NuRE	element de resposta a Nur77
Nurr1	gen relacionat amb Nur77
ODN	oligodeoxinucleòtid
PDGF	factor de creixement derivat de plaquetes
PIP₂	fosfatidil inositol-4,5-bisfosfat
PIP₃	fosfatidil inositol-1,4,5-trifosfat
PL-Cβ	fosfolipasa C β
PKA	proteïna cinasa A

PKC	proteïna cinasa C
PS	fosfatidil serina
PUFA	àcids grassos poliinsaturats
PPARs	receptors activats per proliferadors peroxisomals
RAR	receptor de l'àcid retinòic
RNA	àcid ribonuclèic
RNA pol II	RNA polimerasa II
RXR	receptor del retinòid X
S	serina
S1P	esfingosina-1-fosfat
SREBP	proteïna d'unió als elements de resposta a esterols
T	treonina
TR	receptor de les hormones tiroïdals
VDR	receptor de la vitamina D
VEGF	factor de creixement de l'endoteli vascular
VLDL	lipoproteïnes de densitat molt baixa
Y	tirosina

ÍNDEX:

	<i>PÀGINA</i>
1. INTRODUCCIÓ	1
<i>ATEROSCLEROSIS</i>	1
Factors de risc	2
La hipòtesis inflamàtoria-fibroproliferativa	2
Disrupció de la placa i conseqüències clíniques	7
<i>LIPOPROTEÏNES</i>	9
LDL	9
LDL i aterosclerosis	12
<i>CÈL·LULES MUSCULARS LLISES</i>	14
Activació de els CML	14
CML i aterosclerosis	16
<i>RECEPTORS NUCLEARS</i>	17
Estructura proteica	20
Unió al DNA	24
Regulació de l'expressió gènica pels receptors nuclears	25
Interacció dels receptors nuclears amb altres vies de transducció de senyals	27
NOR-1	28
<i>MECANISMES DE TRANSDUCCIÓ DE SENYALS</i>	32
Proteïnes G heterotrimèriques.....	34
Proteïnes cinasa	35
CREB	39

	<i>PÀGINA</i>
2. OBJECTIUS	42
3. RESULTATS	44
4. DISCUSSIÓ.	85
<i>NOR-1 S'EXPRESSA A LES CML</i>	<i>85</i>
<i>VIES DE TRANSDUCCIÓ DE SENYALS INVOLUCRADES EN L'EXPRESSIÓ</i> <i>DE NOR-1.....</i>	<i>87</i>
<i>NOR-1 REGULA LA PROLIFERACIÓ DE LES CML</i>	<i>92</i>
Pot ser NOR-1 una nova diana farmacològica en el tractament de l'aterosclerosi?	<i>95</i>
5. CONCLUSIONS.....	97
6. REFERÈNCIES	99

ATEROSCLEROSIS

El nombre de persones amb malalties cardiovasculars està augmentant a tot el món. A l'actualitat no sols són la principal causa de mort als països desenvolupats, sinó també en molts en vies de desenvolupament (Ysuf S. *et al.* 2001) a conseqüència principalment de canvis en els hàbits dietètics i de vida com fumar o el sedentarisme, així com per l'augment de l'esperança de vida (Bonow RO. *et al.* 2002).

L'aterosclerosi és la principal causa subjacent a aquestes malalties. Es caracteritza per provocar un engruiximent de la paret arterial que ocasionalment pot produir l'oclusió de la llum del vas, ocasionant complicacions clíniques com són l'infart cerebral i de miocardi, així com de la gangrena i pèrdua de les extremitats (Ross R. 1993).

L'origen i les causes de la progressió de l'aterosclerosi no han estat clares fins fa poc temps. Inicialment es van proposar dues hipòtesis alternatives: La hipòtesis trombògena suggeria que el factor determinant era l'acumulació de dipòsits de fibrina en la paret arterial, els quals serien remodelats per l'acció de fibroblasts (Von Rokitansky C. 1852). L'altre hipòtesis va venir suggerida pel fet, que a l'alimentar conills amb una dieta rica en colesterol, aquests desenvolupaven aterosclerosi (Anitskchow N. 1913). Aquests experiments van fer plantejar el model segons el qual, l'aterosclerosi és produïa per una acumulació de lípids a la paret arterial.

Actualment aquestes dues teories s'han fusionat i ampliat, l'aterosclerosi es considera com un procés caracteritzat per una resposta de tipus inflamatori-fibroproliferatiu a un determinat dany que ha patit l'artèria (Ross R. 1999, Libby P. 2002). Aquest procés ocasiona un augment de la mida de la intima arterial on es

dipositen diferents tipus cel·lulars com cèl·lules musculars llises (CML), macròfags i limfòcits T així com matriu extracel·lular i dipòsits de colesterol i calci.

FACTORS DE RISC

L'aterosclerosi, s'origina com a resposta a un dany que ha rebut la paret arterial i existeixen diferents factors de risc que predisposen a patir aquest procés. Alguns d'ells són alteracions en el metabolisme lipídic, com tindre en plasma concentracions elevades de lipoproteïnes de baixa densitat (*low density lipoproteins*, LDL) o de triglicèrids així com concentracions baixes de lipoproteïnes d'alta densitat (*high density lipoproteins*, HDL). Altres factors de risc són la hipertensió, l'hàbit tabàquic, diabetes, hiperhomocisteïnèmia, diverses alteracions genètiques i infeccions per certs tipus de virus o bacteris com *Chlamydia pneumoniae*.

A les artèries coronaries, el principal factor de risc per desenvolupar aterosclerosi, és patir hipercolesterolèmia a conseqüència de tenir uns nivells alts de LDL (Verschuren WM. *et al.* 1995, Durrington P. 2003). A més a més, nivells elevats de LDL són una causa suficient per a desenvolupar aterosclerosi, com passa en el cas de persones que tenen mutat el receptor de les LDL, les quals desenvolupen greus lesions ateroscleròtiques abans dels 10 anys de vida.

Però l'hipercolesterolèmia no és l'únic factor de risc, ja que la meitat de persones afectades d'aterosclerosi tenen nivells normals de LDL (Braunwald, JL 1997). Entre d'altres cal destacar la hipertensió arterial i la diabetes, els quals són els principals factors de risc per patir malaltia isquèmica cerebrovascular o malaltia arterial perifèrica respectivament. Normalment, el que succeeix és que es tenen diferents factors de risc, els quals coopere entre ells per afavorir l'aparició d'una lesió ateroscleròtica.

LA HIPÒTESIS INFLAMÀTORIA-FIBROPROLIFERATIVA

Les artèries grans i mitjanes tenen una estructura semblant. Estan formades per tres capes concèntriques: íntima, mèdia i adventícia. La íntima és la capa que està en contacte amb la llum del vas i està formada per una monocapa de cèl·lules endotelials i per la làmina basal les quals estan separades de la mèdia per la làmina elàstica interna. La mèdia esta constituïda per cèl·lules musculars llises amb capacitat contràctil les quals

són les responsables de mantindre el to del vas. Separada per la làmina elàstica externa està l'adventícia constituïda per fibroblasts i matriu extracel·lular.

L'endoteli, a més de constituir una barrera física entre la sang que circula per la llum de l'artèria i la paret, regula múltiples funcions del vas, entre les quals cal destacar mantindre el to vascular, un estat de baixa trombogenicitat, així com regular la permeabilitat de la paret vascular a macromolècules com lipoproteïnes i cèl·lules com monòcits o limfòcits circulants.

La disfunció endotelial

Quan l'endoteli es danya per alguna agressió es produeix una disfunció endotelial, o sigui l'endoteli perd algunes de les seves capacitats i es produeix una resposta de tipus inflamatori per eliminar l'agent responsable. Els factors de risc el que ocasionen en un primer terme és originar directa o indirectament una agressió a l'endoteli que produeix una disfunció endotelial. Per exemple en el cas de les LDL, quan hi ha nivells elevats es queden retingudes a la intima on es poden modificar i danyar l'endoteli. En el cas de l'hàbit tabàquic, el fum del tabac ocasionaria la producció de radicals lliures que també danyarien les cèl·lules endotelials.

Les lesions ateroscleròtiques no estan uniformement distribuïdes per les artèries, sinó que es troben preferentment en llocs on es trenca el flux laminar normal com poden ser curvatures o ramificacions. En aquests llocs les cèl·lules endotelials sobreexpressen determinats gens, com els que codifiquen per proteïnes d'adhesió, que poden afavorir l'avanç de l'aterosclerosi. En contraposició hi ha gens que codifiquen per proteïnes amb activitats "ateroprotectores", els quals s'expressen en condicions de flux laminar. Alguns exemples poden ser la superòxid dismutasa (SOD) (Inoue N. *et al.* 1996) o l'òxid nítric sintasa endotelial (*endothelial nitric oxide synthase*, eNOS) (Inoue N. *et al.* 1996 i Topper JN. *et al.* 1996). Aquest fet ha portat a l'aparició del concepte d'ateroprotecció referint-se a quines propietats de l'endoteli el fan resistent a l'aparició d'una lesió ateroscleròtica.

La pèrdua de l'expressió d'aquests gens en zones de flux turbulent pot afavorir l'aparició d'una lesió ateroscleròtica, com per exemple en el cas d'una disminució de l'expressió de l'eNOS. L'eNOS és l'enzim responsable de generar òxid nítric (NO) en l'endoteli en condicions normals. L'NO indueix la relaxació del vas, redueix l'agregació plaquetar i també inhibeix l'expressió de molècules d'adhesió com la molècula

d'adhesió de cèl·lules vasculars-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*, VCAM-1) a través de la inhibició del factor nuclear- κ B (*nuclear factor κ B*, NF- κ B) (De Caterina R *et al.* 1995). El fet de que es produeixin canvis en l'expressió gènica depenent quina part de l'artèria sigui, donen una possible explicació al fet de que les lesions ateroscleròtiques tinguin tendència a aparèixer en algun llocs concrets.

En circumstàncies normals l'endoteli té una baixa adhesivitat pels leucòcits circulants, però quan es produeix una situació que ocasiona estrès o dany a l'endoteli, aquest expressa proteïnes d'adhesió per reclutar monòcits i limfòcits (Fig 1). Un cop els leucòcits s'han unit a l'endoteli, entren a la paret del vas a través de les unions de les cèl·lules endotelials, aquest fenomen és afavorit per diferents quimocines com la proteïna quimioattractant de monòcits-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*, MCP-1) (Yla-Herttuala S. *et al* 1991) o la interleucina-8 (IL-8), les quals es troben presents en les plaques d'ateroma.

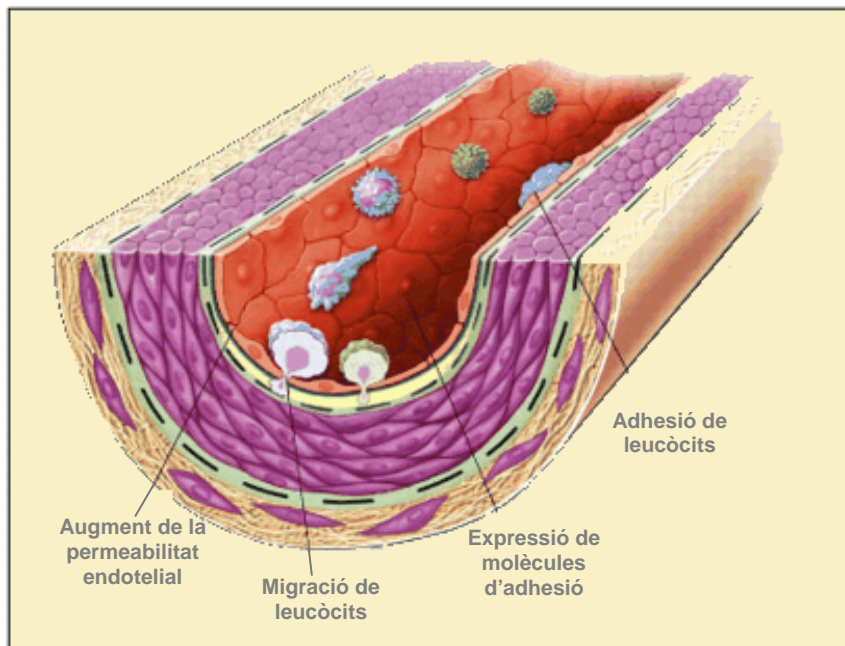


Fig 1. Disfunció endotelial. La disfunció endotelial promou l'adhesió i entrada de leucòcits a l'espai subendotelial. A més a més també s'augmenta la permeabilitat de l'endoteli al pas de macromolècules com poden ser lipoproteïnes. Adaptat de Ross R. 1999.

A la paret arterial, els monòcits es diferencien en macròfags, especialment en presència del factor estimulant de colònies de macròfags (*macrophage colony-stimulating factor*, M-CSF). Aquests, un cop s'han diferenciat, poden expressar diferents receptors per captar lipoproteïnes modificades, d'aquesta manera s'omplen de colesterol i poden esdevenir cèl·lules escumoses. A més a més els macròfags generen diferents molècules que indueixen a que CML de la mèdia migrin a la intima on podran proliferar. Aquest procés genera un petit engruiximent de la paret arterial conegut com estria grassa, el qual és essencialment benigne (Fig 2).

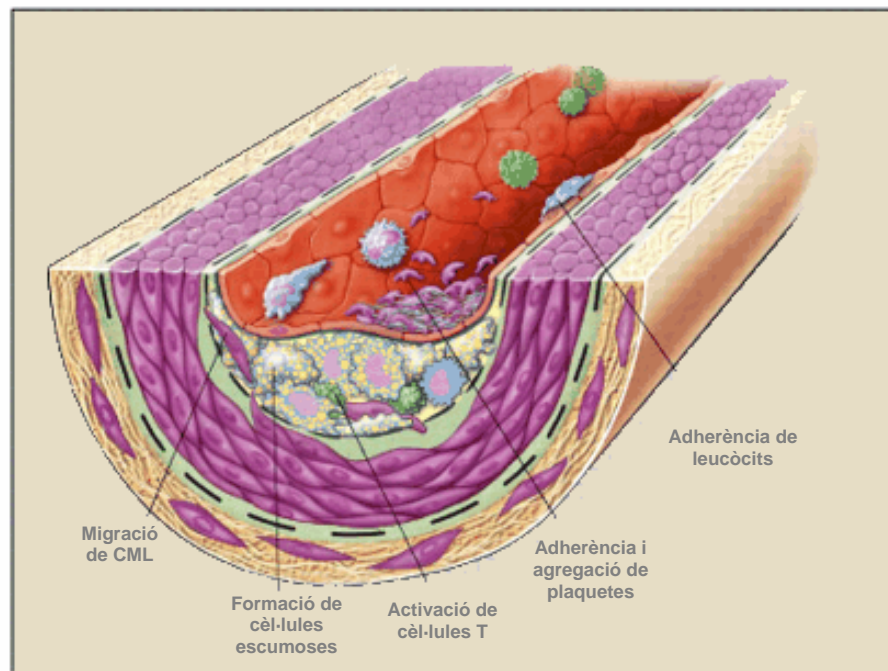


Fig 2. Formació de l'estria grassa. L'acúmulo de macròfags i CML poden ocasionar un engruiximent de la paret arterial conegut com a estria grassa. Aquest fet juntament amb la disfunció endotelial subjacent poden propiciar l'adhesió plaquetar, fet que contribuirà a la progressió de la lesió. Adaptat de Ross R. 1999.

Trombogenesis i progressió de la lesió

Tradicionalment s'havia vist el creixement de la placa ateroscleròtica com un procés continu, en el qual es produïa una migració i proliferació de CML en la intima les quals sintetitzaven una malla de matriu extracel·lular. Actualment s'ha pogut observar mitjançant estudis angiogràfics que aquest procés no és continu. (Bruschke AV. *et al.* 1989, Yokoya K. *et al.* 1999), sinó que períodes d'estabilitat en la placa en els quals no hi ha canvis substancials en la seva estructura i composició, es veuen trencats per períodes on hi ha grans fenòmens de proliferació i remodelatge. El desencadenant d'aquest procés sembla que són processos trombògens. Aquests poden tindre diferent origen, però acaben produint un remodelatge de la placa que molts cops fa que vagi augmentant la seva vulnerabilitat.

Hi ha tres mecanismes principals pels quals es pot generar un procés trombogen a la placa (Badimon L. *et al.* 1992, Fuster V. *et al.* 1992 a,b):

- Una manera es que es produeixi una descamació de l'endoteli, la qual deixi exposades a la llum del vas proteïnes trombògenes com el colagen o el factor de von Willebrand. En les plaques ateroscleròtiques aquest procés és més greu ja que poden expressar molècules pro-trombògenes com el factor tissular, els quals augmentaran la resposta trombògena.
- En les plaques ateroscleròtiques es generen petits vasos per angiogenesis. Aquests són fràgils i tenen predisposició a trencar-se i produir microhemorràgies, les quals ocasionaran la producció del trombe corresponent.
- El tercer mecanisme és que es trenqui la coberta fibrosa de la placa, deixant al descobert el nucli lipídic ric en substàncies trombògenes. Aquests és el cas més greu i pot ocasionar l'oclusió del vas pel coàgul que es formi. Encara que en altres casos pot ser que no ocasioni cap simptomatologia clínica, si que deu tindre efectes importants en el remodelatge de la placa.

La producció d'un trombe genera potents mediadors com el factor de creixement derivat de plaquetes (*platelet-derived growth factor*, PDGF) produït per les plaquetes o la formació de trombina. Aquestes dues proteïnes són factors de creixement molt potents per les CML (Davies PF. i Ross R. 1978, Zetter BR. i Antoniades HN. 1979), les quals migraran i proliferaran per remodelar la placa.

En el cas que el dany sobre l'endoteli i el vas en general prossegueixi, s'ocasiona una resposta inflamatòria més aguda seguida d'una de tipus fibroproliferatiu per protegir l'àrea danyada. En aquests cas es poden acabar generant lesions avançades, potencialment perilloses i ocasionalment mortals (Fig 3). Aquesta resposta fibroproliferativa és semblant a l'observada en altres processos inflamatoris fibroproliferatius com en l'artritis reumatoide o la cirrosi hepàtica encara que té característiques pròpies (Ross R. 1999).

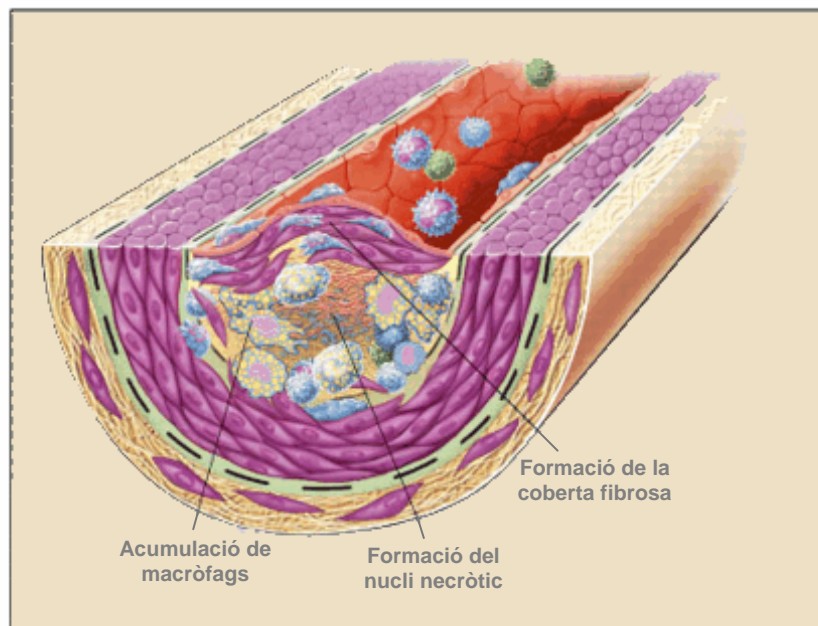


Fig 3. Formació d'una lesió ateroscleròtica avançada. Sota una agressió continuada en el vas i sota diferents estímuls es produeix un augment del nombre de macròfags i cèl·lules escumoses que poden acabar morint constituint un nucli necròtic ric en colesterol i altament pro-trombògen. Al voltant d'aquest les CML sintetitzen una coberta fibrosa que dona estabilitat mecànica a la placa ateroscleròtica. Adaptat de Ross R. 1999.

DISRUPCIÓ DE LA PLACA I CONSEQÜÈNCIES CLINQUES

En el cas de que la placa es trenqui pot formar-se un trombe que obturi la llum del vas (Fig 4), aquest fet pot ocasionar una isquèmia a l'òrgan afectat produint un infart. Normalment la ruptura es produeix a la zona que uneix la placa amb la paret sana del vas, anomenada espatlla de la placa (Badimon JJ. *et al* 1992, Badimon L. 1992, Fuster V. *et al.* 1996). Aquesta és una zona rica en dipòsits lipídics i macròfags i pobre en CML i matriu extracel·lular (Davies MJ *et al* 1993). Les raons perquè la placa es trenca no estan molt clares (Libby P. i Aikawa A 2002, Shah PK. 2003), però sembla

que el desencadenant és la pèrdua de la coberta fibrosa que cobreix el nucli lipídic (Fernandez-OrtizA. *et al.* 1994). Entre els factors que podrien desencadenar aquest procés està la producció de citocines inflamatòries per part de limfòcits T que inhibeixen la producció de matriu extracel·lular per part de les CML (Amento EP. *et al.* 1991) així com la mort d'aquestes cèl·lules per apoptosi (Geng YJ i Libby P. 1995). A més a més també s'ha observat un augment en la producció de metaloproteïnases de matriu (*matrix metalloproteinases*, MMP) (Galis ZS *et al.* 1994), les quals són les responsables de la degradació de la matriu extracel·lular. Tots aquests processos debiliten l'estructura de la placa en una zona, la de l'espalla, ja de per si làbil, fent que fàcilment es pugui trencar al ser sotmesa algun esforç mecànic com pot ser a conseqüència d'un canvi sobtat en la intensitat o el règim circulatori.

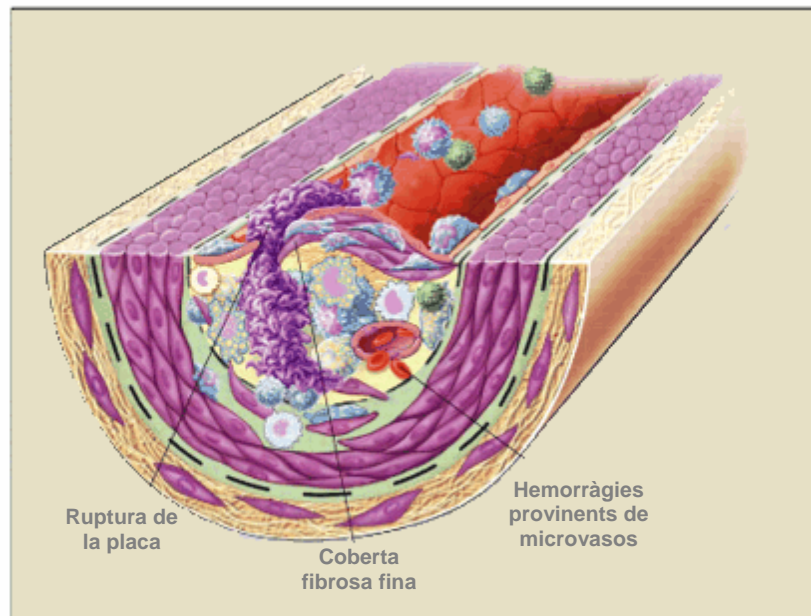


Fig 4. Ruptura de la placa. En el cas que la coberta fibrosa es trenqui i quedi exposat el contingut trombogen de la placa es formarà un trombe que ocasionalment podrà obstruir la llum del vas. Adaptat de Ross R. 1999

LIPOPROTEÏNES

Les lipoproteïnes són les partícules responsables de transportar lípids entre els diferents teixits. Estan formades per una part proteïca, que pot estar constituïda per una o més proteïnes anomenades apolipoproteïnes (Apo) i per una part lipídica. Aquesta última està formada per lípids totalment hidrofòbics, com triglicèrids i èsters de colesterol que estan situats en el centre de la lipoproteïna i per lípids anfipàtics com fosfolípids o colesterol situats a la superfície de la partícula.

Les lipoproteïnes es poden classificar segons la seva densitat en quilomicrons i lipoproteïnes de molta baixa densitat (*very low density lipoproteins*, VLDL), lipoproteïnes de densitat intermitja (*intermediate density lipoproteins*, IDL), lipoproteïnes de baixa densitat (*low density lipoproteins*, LDL) i lipoproteïnes d'alta densitat (*high density lipoproteins*, HDL). Aquests grups no són homogenis, sinó que estan formats per diferents tipus de molècules constitutives lipoproteïnes en les quals poden variar la seva composició i la seva mida tant d'apolipoproteïnes com de lípids.

LDL

Les LDL són les lipoproteïnes responsables de subministrar colesterol als teixits extrahepàtics. Són un producte del metabolisme de les VLDL (Havel RJ. 1984) (Fig 5), les quals són el principal vehicle de transport de lípids en els períodes post-absortius.

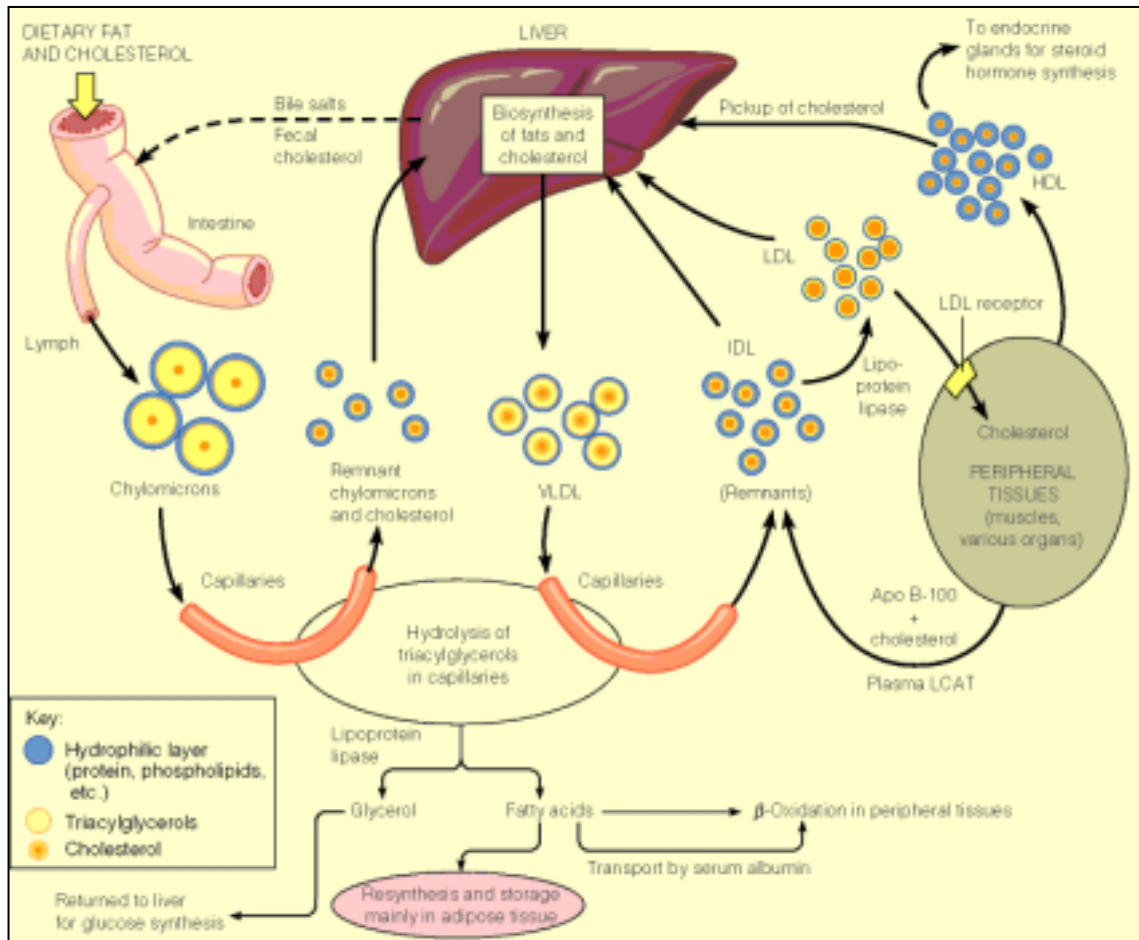


Fig. 5. Metabolisme lipoproteic. Els triglicèrids provinents de la dieta o sintetitzats pel fetge són transportats per quilomicrons o VLDL respectivament per ser usats pels diferents teixits. Les LDL provenen del metabolisme final de les VLDL i són usades per subministrar colesterol a les cèl·lules. Adaptat de *Mathews, van Holde, and Ahern a Biochemistry*.

Les VLDL són sintetitzades en el fetge i estan formades bàsicament per triglicèrids i per diferents apolipoproteïnes entre les quals cal destacar l'apo B100. Un cop sintetitzades, les VLDL són alliberades a la circulació sanguínia on són substrat de l'enzim lipoprotein lipasa (LPL). Aquest enzim es troba situat en la cara luminal de l'endoteli de vasos que irriguen òrgans consumidors d'àcids grassos com pot ser el miocardi. La LPL catalitza l'hidròlisi dels triglicèrids en àcids grassos i glicerol, els àcids grassos s'uniran a l'albumina, la qual pot passar la barrera endotelial i d'aquesta manera seran accessibles per les cèl·lules dels teixits que expressen LPL.

Al perdre triglicèrids, disminueix la mida de les VLDL així com augmenta la seva densitat convertint-se en IDL. Les IDL tenen dos destins metabòlics, o bé poden

ser captades pel fetge, o bé poden transformar-se en LDL mitjançant la LPL hepàtica (HPLP). Aquest enzim és molt semblant a la LPL i també catalitza la hidròlisi de triglicèrids, això fa que finalment en el nucli de la lipoproteïna sols restin èsters de colesterol, així com també, es perdin totes les apolipoproteïnes llevat de l'apo B100, sent aquesta l'única present en les LDL. Per tant les LDL estan formades per un nucli consistent d'èsters de colesterol embolcallats per una copia d'apo B100 i per fosfolípids i colesterol no esterificat.

Les cèl·lules incorporen el colesterol que transporten les LDL a través de receptors presents en quasi totes les cèl·lules, principalment en els hepatòcits, els quals capten aproximadament el 50 % de les LDL. No obstant això, en determinades ocasions les LDL poden ser captades per altres receptors

Catabolisme de les LDL

Les LDL poden passar l'endoteli per transcitosi i així poguer ser captades per les cèl·lules que necessitin colesterol. Les cèl·lules capten les LDL pel receptor de les LDL (*LDL receptor*, LDLR) també anomenat receptor apo B/E ja que pot unir lipoproteïnes que tinguin apo B o apo E. Aquest és un receptor de tipus endocític (Brown MS. i Goldstein JL. 1986). Els LDLR estan concentrats en petites invaginacions de la membrana plasmàtica d'uns 150-500 nm de diàmetre. Un cop s'uneix la LDL al seu receptor mitjançant certs dominis de l'apo B100, el receptor s'internalitza en endosomes, on mentre els receptors es reciclen a la membrana plasmàtica, les LDL segueixen la ruta lisosomal. En els lisosomes l'apo B100 es degrada així com els èsters de colesterol obtenint-se colesterol i l'àcid gras corresponent. El colesterol obtingut s'usa per la síntesi de membranes o s'acumula a la cèl·lula en forma d'èsters de colesterol.

A l'augmentar la concentració intracel·lular de colesterol es produeix la inhibició de l'activitat del factor de transcripció proteïna d'unió als elements de resposta a esterols-2 (*sterol response element binding protein-2*, SREBP-2) (Horton JD. *et al.* 2002). SREBP-2 regula l'expressió de diferents gens del metabolisme del colesterol, com el receptor de les LDL així com dels enzims claus de la síntesi de colesterol. Al disminuir l'activitat de SREBP-2, es disminueix l'expressió d'aquests gens i així s'evita l'augment de la quantitat de colesterol en les cèl·lules, fet que podria tindre conseqüències tòxiques.

Aquest és el procés que passa en la majoria de les cèl·lules, però quan s'acumulen LDL a la intima, per exemple en condicions d'hipercolesterolèmia (Onitiri AC. *et al.* 1976), diferents tipus cel·lulars com ara macròfags (Goldstein JL *et al.* 1979) i pot ser també CML (Pitas RE. 1990), poden seguir captar colesterol provinents de LDL modificades a través d'altres receptors diferents al LDLR. Encara que no està clar el paper que els hi pot correspondre *in vivo*, les principals modificacions que s'han caracteritzat en les LDL acumulades són oxidacions, acetilacions, glicosilacions (aquesta modificació podria ser important en persones que pateixen diabetes) i agregació.

La modificació més ben caracteritzada és l'oxidació. Les LDL retingudes a la intima a causa de la seva unió amb proteoglicans podrien oxidar-se, sobretot en zones de la placa on es generin grans quantitats de espècies reactives de l'oxigen (*reactive oxygen species*, ROS). Aquestes LDL oxidades no són captades pel LDLR, sinó per receptors "escombriaire" (*scavenger*) tipus SRA (Kodama T *et al.* 1988) i CD36 (Endemann G. *et al.* 1993) els quals són altament expressats pels macròfags de la placa (Nakata A. *et al.* 1999). D'aquesta manera els macròfags poden endocitar aquestes partícules que són eventualment danyines. Però aquests receptors, a diferència del LDLR, no es deixen d'expressar quan les cèl·lules acumulen colesterol, per la qual cosa la cèl·lula segueix captant colesterol fins que arriba a convertir-se en una cèl·lula escumosa. Aquestes cèl·lules estan plenes de colesterol, en un cas més extrem aquesta cèl·lula pot morir alliberant el colesterol que posseïa en l'interior a la intima i empitjorant la situació ja que aquest colesterol és tòxic i al ser captat per altres macròfags farà que es converteixen en cèl·lules escumoses.

LDL I ATEROSCLEROSIS

Com ja s'ha comentat, concentracions elevades de LDL són un dels principals factors de risc per patir aterosclerosis encara que, no estan clars els mecanismes moleculars responsables d'aquest procés. Les LDL es poden quedar retingudes a la intima unides a proteoglicans on podran patir modificacions i ser captades per macròfags i CML presents a la paret. Aquestes cèl·lules acumularan colesterol i aquest colesterol pot tindre diferents efectes tòxics per les cèl·lules (Tabas I. 2002) així com canviar l'expressió de diferents gens, molts cops amb conseqüències aterogèniques. Per exemple, les LDL disminueixen l'expressió de diferents enzims amb propietats

antiaterogèniques com l'eNOS (Vidal F. *et al.* 1998) o que contribueixen en l'estabilitat de la placa com la lisil oxidasa (Rodríguez C. *et al.* 2003). L'acumulació de colesterol pot provocar la mort de macròfags per necrosi i apoptosi (Reid VC. *et al.* 1993 i Reid VC. *et al.* 1993), fet relacionat amb la ruptura de la placa d'ateroma com ja s'ha comentat.

Per altre banda, recentment s'han caracteritzat les LDL com a factors de creixement o en general com a partícules capaces d'actuar com a molècules senyalitzadores que indueixen a les cèl·lules a proliferar, migrar o diferenciar-se.

Les LDL com a factors de creixement

Les LDL poden actuar com un factor de creixement clàssic activant diferents vies de transducció de senyals, així com també pot induir la proliferació de CML (Libby P. *et al.* 1985, Chen JK. *et al.* 1986). Entre d'altres efectes, les LDL poden augmentar les concentracions intracel·lulars de calci (Sachinidis A. *et al.* 1990), estimular el metabolisme de fosfoinositòids i la translocació a la membrana de la proteïna cinasa C (*protein kinase C*, PKC) (Scott-Burden T *et al.* 1989), activar la via de la proteïna cinasa regulada per senyals extracel·lulars (*extracellular signal regulated kinase*, ERK) (Sachinidis A. *et al.* 1997) i regular l'activitat de la proteïna activadora-1 (*activated protein-1*, AP-1) (Zhu Y. *et al.* 1998). Alguns d'aquests efectes es produeixen a través de proteïnes G sensibles a toxina pertussis (Sachinidis A. *et al.* 1997) i independents del receptor clàssic de les LDL, el LDLR (Metzler B *et al.* 1999). Les proteïnes G normalment transdueixen la senyal des de receptors amb 7 dominis transmembrana també anomenats receptors acoblats a proteïnes G (*G-protein coupled receptors*, GPCR), per tant sembla que les LDL podrien tindre altres receptors que podrien ser tipus GPCR. En concordança amb aquesta idea s'ha identificat un possible lloc d'unió de les LDL a les CML que seria diferent al LDLR i que estaria implicat en el metabolisme de fosfoinositòids (Tkachuk VA. *et al.* 1994). Però encara no s'ha trobat cap receptor tipus GPCR que s'uneixi a les LDL.

Hi ha dues altres possibilitats per les quals les LDL podrien activar GPCR i d'aquesta manera activar diferents vies de transducció de senyals. Una d'elles seria que les LDL activessin de manera poc específica diferents receptors. Encara que l'afinitat per cada tipus de receptor fos baixa, al ser partícules relativament grans i estar formades per diferents components podrien activar més d'un receptor a la vegada i d'aquesta manera obtindre una resposta prou elevada per activar diferents vies de transducció de

senyals d'una manera similar a la que ho fa la llum ultraviolada o l'estrès osmòtic (Rosette C. i Karin M. 1996). L'altre mecanisme proposat seria que el responsable de l'acció fos algun component de les LDL, el qual s'unís amb alta afinitat algun receptor específic i d'aquesta manera pogués activar diferents vies de transducció de senyals. En concordança amb aquesta hipòtesis, s'ha trobat que diferents components lipídics presents en les LDL com la esfingosina-1-fosfat (*sphingosine-1-phosphate*, S1P) (Sachinidis A. *et al.* 1999) o l'àcid araquidònic (Rao GN. *et al.* 1994), poden activar diferents vies de transducció de senyals en cèl·lules vasculars.

Per tant ja sigui la LDL com a partícula sencera, com sigui per part dels lípids que transporta, les LDL poden induir diversos estímuls en les cèl·lules de la paret vascular, els quals poden afavorir la progressió de la lesió ateroscleròtica. El fet que les LDL actuïn com un factor de creixement obre les portes a trobar noves dianes farmacològiques en el tractament de l'aterosclerosi induïda per hipercolesterolèmia.

CÈL·LULES MUSCULARS LLISES

En condicions fisiològiques la funció de les cèl·lules musculars llises (CML) vasculars és mantindre el to del vas, ja que gràcies a la seva capacitat contràctil poden regular el diàmetre d'aquest i així regular el pas de corrent sanguínia segons les necessitats de l'òrgan irrigat (Owens GK. 1996). Les CML constitueixen la mèdia de la paret arterial i estan empaquetades en miofilaments contractils. Però a més a més d'aquesta funció, les CML també poden exercir altres efectes com en la reparació vascular. En aquests cas les CML pateixen un canvi de fenòtip conegut com activació de les CML.

ACTIVACIÓ DE LES CML

Quan es produeix un dany en el vas les CML de la mèdia poden migrar a la íntima en resposta a diferents estímuls produïts en el transcurs de la lesió. Allí proliferaran i sintetitzaran matriu extracel·lular per remodelar la paret i així participar en la resposta al dany. La importància de la proliferació de les CML està sota controvèrsia ja que sembla que en lesions ateroscleròtiques humanes avançades la taxa de proliferació de CML és baixa (Gordon D. *et al.* 1990, O'Brien ER. *et al.* 1993). Però la

proliferació de les CML podria produir-se en etapes primerenques de la lesió ateroscleròtica o bé en moments molt concrets. Per exemple quan s'ocasiona un procés trombogen s'allibera PDGF i trombina que com ja s'ha comentat, són factors de creixement per les CML els quals indueixen la seva migració i proliferació. També s'ha de tindre present que encara que la taxa de proliferació de les CML sigui baixa, hi haurà molt de temps perquè aquest fenomen tingui lloc ja que les CML estan presents des de l'inici de la formació de l'estria grassa en individus joves (Katsuda S. *et al.* 1992). Recentment, però també s'ha observat que CML de l'intima també podrien provindre de cèl·lules circulants (Hillebrands JL. *et al.* 2001, Campbell JH. *et al.* 2001, Sata M. *et al.* 2002), encara que no s'ha demostrat la contribució d'aquestes cèl·lules en l'evolució de l'aterosclerosi.

Proliferació de les CML

Les CML proliferen quan en el medi estan presents diferents factors mitogènics, com poden ser PDGF o trombina o altres factors de creixements produïts per cèl·lules de la placa com poden ser el factor de creixement epidèrmic (*epidermal growth factor*, EGF) (Bhargava G. *et al.* 1979) o el factor de creixement de fibroblasts bàsic (*basic fibroblasts growth factor*, bFGF) (Esch F. *et al.* 1985).

Els factors de creixement mitogènics activen a diferents receptors presents en la membrana plasmàtica de les cèl·lules i activen diferents vies de transducció de senyals, encara que tots tenen un punt final comú: el cicle cel·lular (Jones SM. i Kazlauskas A. 2001, Dzau VJ. *et al.* 2002). En el cicle cel·lular les cèl·lules quiescents (G_0) entren en un període (G_1) en el qual es sintetitzen els elements necessaris per la síntesis del nou DNA que es produeix en la fase S. Després de que tot el DNA s'hagi replicat les cèl·lules entren en una fase (G_2) de preparació per la mitosis (M). Finalment el cicle s'acaba obtenint-se dues cèl·lules. Aquestes podran sortir del cicle cel·lular i diferenciar-se o tornar a entrar en G_1 segons els estímuls que hagin en el medi.

Aquest procés està controlat principalment en dos punts de control anomenats punts de restricció (R) a la fi de G_1 i G_2 a més a més d'un altre en la mitosis. El pas per aquests punts estan regulats per les cinases dependents de ciclines (*cyclin-dependent kinases*, CDKs) les quals formen holoenzims amb les seves subunitats reguladores, les ciclines. Aquestes integren diferents senyals tant extracel·lulars com intracel·lulars i permeten a la cèl·lula passar els punts de restricció i avançar en el cicle cel·lular. Els complexos ciclines-CDKs tenen múltiples punts de regulació, els principals són canvis

en els nivells l'expressió de ciclines i la seva proteolisis, l'estat de fosforilació de les CDKs i la presència d'inhibidors de cinases dependents de ciclines (*cyclin dependent kinases inhibitors*, CKIs) com p27^{kip1} o p21^{cip1}.

La presència de mitògens és essencial per passar el punt de restricció de G₁, un cop s'ha sobrepassat aquest punt, encara que no hagi més mitògens les cèl·lules podran acabar el cicle cel·lular. Les senyals mitogèniques activen la transcripció de determinats gens que seran els responsables a la seva vegada d'activar la transcripció de les ciclines responsables de passar la fase G₁, com les ciclines D i E. Encara que es coneixen bastants gens responsables de regular aquest procés en resposta a senyals mitogèniques com poden ser c-fos o CREB, en les CML, encara no es té un model complet a nivell molecular de com es desenvolupa aquest procés.

CML I ATEROSCLEROSIS

Les CML poden tindre diferents papers en l'evolució de l'aterosclerosis. Per una banda participen en la formació de l'engruiximent arterial, sobretot en les primeres etapes de la lesió, a més a més una proliferació excessiva de les CML està en l'origen de diferents patologies vasculars com en la restenosis post-angioplastia o en la fallida d'una derivació (*bypass*) amb un empelt venós. En aquests casos es produeix un engruiximent de la intima que pot produir l'obstrucció del vas. Per altre banda les CML formen una coberta de matriu extracel·lular que dona estabilitat mecànica a la placa i la fa menys susceptible a la ruptura.

A més a més les CML poden produir diferents substàncies que modulen la contracció i relaxació del vas, així com factors que regulen la inflamació, la proliferació, l'apoptosi i l'estructura de la matriu. Per tant el paper de les CML en el desenvolupament de l'aterosclerosis és complex i segurament serà diferent segons l'estadi i tipus de lesió.

Modulació de la proliferació de les CML com a estratègia terapèutica

Com ja s'ha comentat les CML juguen un paper clau en la progressió de l'aterosclerosi. Sembla que almenys en alguns casos, com en la restenosi post-angioplastia, la clau del mecanisme patològic és una proliferació excessiva de les CML. En aquests casos, s'ha intentat tractar aquestes patologies inhibint la proliferació de les CML. Encara que els resultats d'experiments amb animals han resultat prometedors, generalment no ha sigut així en assaigs clínics (Gershlick AH. 2002). Aquest fet es podria deure a diferències entre espècies o a limitacions en les dosis que es poden emprar en humans.

La proliferació es pot inhibir per mecanismes citoestàtics o citotòxics. En principi serien més aconsellables els primers ja que una mort excessiva de cèl·lules podria resultar en un debilitament en l'estructura del vas i predisposar-lo a patir un aneurisme. Una de les estratègies usades ha sigut en recobrir un estent amb una substància que inhibeixi la proliferació o fer que d'alguna manera aquest l'alliberi. Els resultats més prometedors en assaigs clínics han sigut usant estents recoberts de rapamicina o paclitaxel (Bhargava B. *et al.* 2003), substàncies que inhibeixen la proliferació cel·lular.

Altres estratègies terapèutiques poden ser l'ús de diferents estratègies de teràpia gènica per inhibir o activar gens implicats en la regulació del cicle cel·lular. Les eines que es poden usar en aquest últim cas són oligonucleòtids antisentit, RNAs curts d'interferència (*short interference RNA*, siRNA), esquers (*decoys*) per factors de transcripció o la sobreexpressió de determinats gens.

Sigui quina sigui la tècnica a usar, sembla que l'estratègia de bloquejar la proliferació de CML és una estratègia racional i que té bones opcions d'èxit.

RECEPTORS NUCLEARS

Els receptors nuclears són una família de factors de transcripció implicats tant en el desenvolupament embrionari com en el manteniment de l'homeostasi. Sembla ser que la seva presència és exclusiva de *Metazoa*, on es troben representats en diferents *phyla* com en *Arthropoda*, *Nematoda* o *Chordata*, (Laudet V. 1997).

El paradigma d'acció d'aquests factors de transcripció és que s'activen quan s'uneix el seu lligand. Aquest és una molècula petita i hidrofòbica, la qual és permeable

a les membranes cel·lulars (Mangelsdorf DJ. *et al.* 1995). Encara que aquest va ser el primer mecanisme que es va trobar, existeixen receptors nuclears sense cap lligand conegut, anomenats receptors orfes, els quals s'han identificat com a receptors nuclears per similitud de seqüències. En els últims anys però, s'han identificat lligands per a nombrosos receptors nuclears orfes, encara que no en tots. En aquest últim cas podria ser que encara no s'hagi identificat, o que no en tinguin i la seva activitat sigui regulada per algun altre mecanisme. Aquest fet no s'ha de considerar com a excessivament estrany ja que s'ha postulat que el receptor nuclear ancestral era constitutivament actiu i no tenia lligand (Laudet V. 1997), per tant algun receptor orfe podria ser constitutivament actiu o ser activat per alguna modificació postraduccionals com pugués ser per fosforilació.

Els primers receptors nuclears clonats van ser el receptor de glucocorticòids (Hollenberg SM. *et al.* 1985, Miesfeld RL. *et al.* 1986) i el d'estrògens (Green S. *et al.* 1986). L'homologia d'aquests receptors amb l'oncogen *v-erbA* va portar al descobriment del *locus c-erbA* com el receptor de les hormones tiroïdals (Sap J. *et al.* 1986, Weinberger C. *et al.* 1986). En els següents anys es van anar descobrint diferents receptors nuclears i el 1990 es va descobrir el primer receptor nuclear orfe, el receptor del retinòid X (*retinoid X receptor*, RXR) (Mangelsdorf DJ. *et al.* 1990). Amb la descoberta dels receptors orfes es va obrir el camp de l'endocrinologia inversa (Kliwer SA. *et al.* 1999). L'aproximació usada en l'endocrinologia "clàssica" és que a partir d'un fenomen fisiològic es descobreix l'hormona que el regula i posteriorment l'hormona purificada s'usa per trobar el seu receptor. Al trobar receptors orfes el procés és el contrari, a partir del receptor es pot trobar l'hormona i d'aquesta manera es pot trobar un nou circuit fisiològic. Aquesta aproximació va ser usada per primer cop per trobar el lligand del RXR, l'àcid 9-cis retinòic (9-cis RA) i d'aquesta manera entendre millor els processos regulats per retinòids.

En l'actualitat es coneixen uns 50 receptors nuclears en humans i usant criteris filogenètics es poden classificar en 6 famílies (Taula 1) (Laudet V. 1997).

Classe	Receptor	Denominació	Lligand
Classe I	TR	Receptor d'hormones tiroïdals	Hormones tiroïdals
	RAR	Receptor de l'àcid retinòic	Àcid retinòic
	VDR	Receptor de la vitamina D	1-25(OH) ₂ Vitamina D ₃
	PPAR	Receptor de proliferadors peroxisomals	PUFAs, eicosanòids
	ROR	Receptor orfe relacionat amb el RAR	Colesterol*
Classe II	RXR	Receptor del retinòid X	Àcid 9-cis retinòic
	HNF-4	Factor nuclear d'hepatòcits-4	Acils CoA*
Classe III	GR	Receptor de glucocorticòids	Glucocorticòids
	ER	Receptor d'estrògens	Estradiol
	AR	Receptor d'andrògens	Andrògens
Classe IV	Nur77		Desconegut
	Nurr1	Nur-77 related gene	Desconegut
	NOR-1	Neuron-derived orphan receptor-1	Desconegut
Classe V	SF-1	Factor esteroïdogenèic-1	Desconegut
Classe VI	GCNF	Factor nuclear de cèl·lules germinals	Desconegut

Taula 1. Classificació filogenètica dels receptors nuclears. La relació de gens presents no és exhaustiva sinó que sols vols ser indicativa, mostrant alguns dels gens més representatius de cada classe. * En aquest casos s'han trobat les substàncies indicades unides als receptors nuclears quan s'ha resolt l'estructura tridimensional d'aquests per difracció de raigs X per no s'ha establert si funcionalment regulen l'activitat del receptor. PUFA: àcids grassos polinsaturats.

D'altra banda, de manera funcional és poden classificar els receptors nuclears en tres grups (Chawla A. *et al.* 2001):

- Receptors endocrins
- Receptors orfes adoptats
- Receptors orfes.

El primer grups està constituït pels receptors d'hormones esteroïdals (classe III) i pel receptors d'hormones tiroïdals, el receptor de l'àcid retinòic (RAR) i el receptor de la vitamina D. Els lligands d'aquests receptors tenen una alta afinitat pel seu receptor (constants de dissociació de l'ordre de 0,01 a 10 nM) i són produïts i secretats de manera molt regulades.

El segon grup està constituït per receptors que fins fa poc eren orfes, però recentment se'ls ha trobat un lligand (han esta "adoptats"). Membres d'aquest grup són els receptors de proliferadors peroxisomals (*Peroxisome proliferator activated receptors*, PPARs), els receptors hepàtics X (*Liver X receptors*, LXRs) o el receptor del farnesòid X (*Farnesoid X receptor*, FXR), entre d'altres. Els lligands d'aquests

receptors són lípids de la dieta o modificacions d'aquests, tenen constants de dissociació més baixes que les dels lligands dels receptors endocrins (són més grans que 1-10 μM). Aquestes concentracions són comparables a les concentracions fisiològiques dels seus lligands i d'aquesta manera poden actuar com a sensors biològics. Aquests receptors controlen l'expressió de gens claus en el metabolisme lipídic i així, responen a variacions en les concentracions dels seus lligands, participen en la regulació de l'homeostasi lipídica. Però a més a més del seu eminent paper en el metabolisme lipídic també estan implicats en altres funcions com els PPARs que regulen la resposta inflamatòria (Ricote M. *et al.* 1998).

L'últim grup està format per receptors orfes, els quals no tenen cap lligand conegut. Encara que en un primer moment no es tenia clar quines eren les funcions d'aquests receptors, en els últims anys se'ls està involucrant en múltiples processos com ara la proliferació, l'apoptosi o la diferenciació.

ESTRUCTURA PROTEÏCA

Els receptors nuclears, com altres factors de transcripció, tenen una estructura molt modular, en la qual els diferents dominis poden ser canviats entre receptors nuclears sense perdre la seva funció. Posseeixen 5 dominis diferenciats (Fig. 6) (Aranda A. i Pascual A. 2001). El domini A/B és molt variable entre els receptors nuclears i té funcions de transactivació. El domini C és el d'unió al DNA i és el més conservat entre els receptors nuclears. El domini D connecta els dominis C i E, té molta llibertat conformacional, fet que permet als dominis C i E possessionar-se entre ells de diferents maneres i molts cops té senyals de localització nuclear. El domini E és el domini d'unió al lligand, té funcions de dimerització i de transactivació. Finalment alguns receptors nuclears a més a més poden tindre un domini C-terminal.

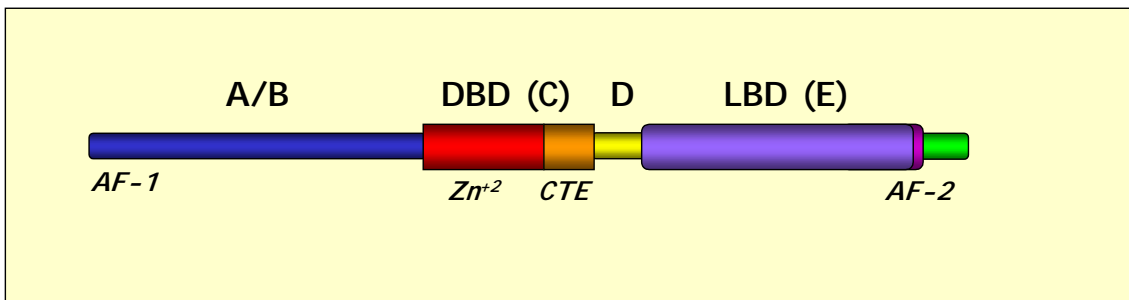


Fig 6. Representació esquemàtica dels dominis dels receptors nuclears. En el domini A/B es troba la regió AF-1, la qual té funcions de transactivació independent de lligand, en el domini C estan els dos dits de zinc i la CTE, implicats tots dos en la unió al DNA. En el domini E està la regió AF-2, responsable de la transactivació depenent de lligand.

Domini d'unió al DNA

El domini d'unió al DNA (*DNA binding domain*, DBD) o domini C és el responsable de la unió dels receptor al DNA i també participa en la formació de dímers (Fig. 7). Està constituït per dos dits de zinc formats per 60-70 aminoàcids i una extensió C-terminal (*C-terminal extension*, CTE) d'uns 25 aminoàcids. Cada dit està constituït per un ió de zinc coordinat de forma tetraèdrica per quatre residus de cisteïna. A la base del primer dit hi ha els residus necessaris per la unió amb el DNA que formen l'anomenada caixa P, uns altres residus en el segon dit formen la caixa D involucrada en la dimerització. Els dos dits es pleguen de forma conjunta per formar una estructura compacta constituïda per dos hèlix α disposades perpendicularment una de l'altre. La primera hèlix s'uneix al solc major del DNA establint contactes amb bases específiques. Finalment la CTE forma una tercera hèlix, la qual està empaquetada amb l'hèlix 1 i també està involucrada en la unió amb el DNA.

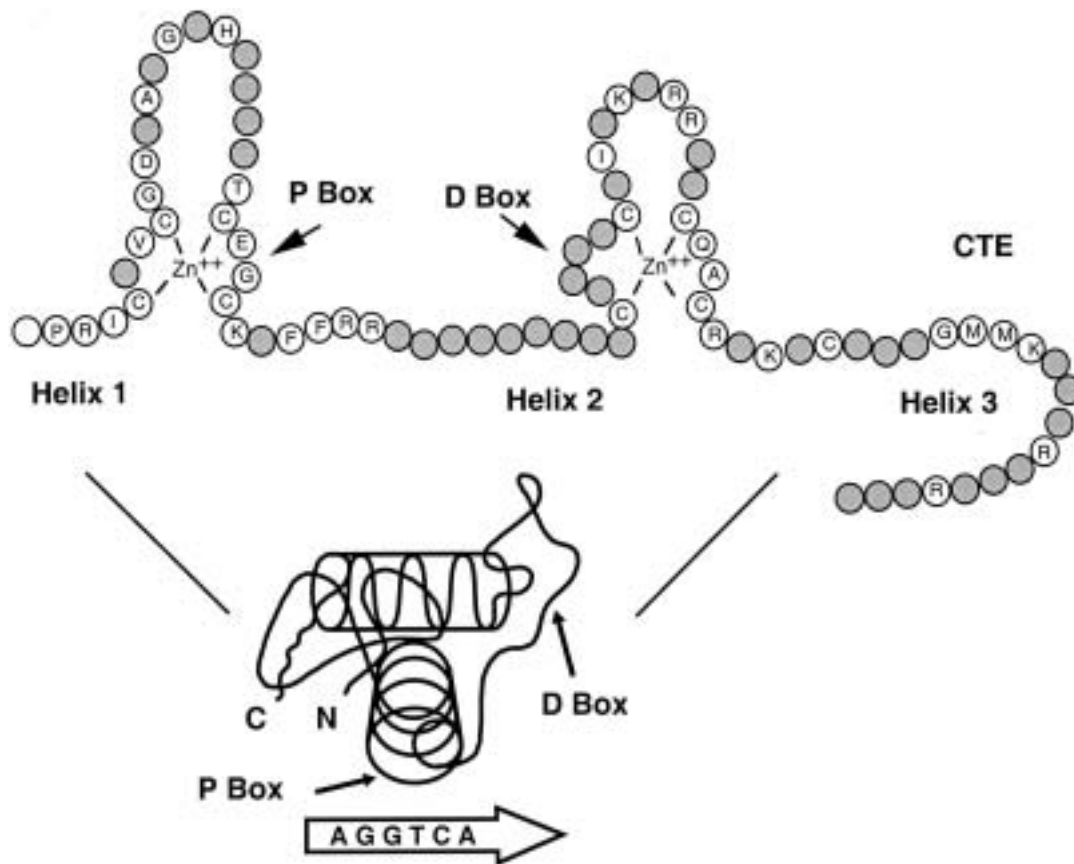


Fig 7. Estructura del DBD dels receptors nuclears. El DBD està compost per dos hèlix α i una extensió C-terminal. Adaptat d'Aranda A. i Pascual A. 2001.

Domini d'unió al lligand

El domini d'unió al lligand (*ligand binding domain*, LBD) és el responsable de la unió al lligand així com també de la formació de dímers, d'unió a cofactors i de la transactivació dependent de lligand. Té dues seqüències molt conservades, el motiu signatura (Ti) i el domini AF-2 responsable de la activació transcripcional dependent de lligand. El LBD està format per uns 250 aminoàcids, els quals tenen una estructura secundària composta per 12 hèlixs α i un gir β entre les hèlix 5 i 6 (Fig 8). El LBD es plega en forma de tres capes d'hèlix antiparal·leles empaquetades. Un nucli central compost per tres hèlix és empaquetat entre dues capes addicionals per crear una butxaca hidrofòbica on s'acomoda el lligand. El domini AF-2 està situat a l'hèlix 12, aquesta en el receptor sense lligand (aporeceptor) es projecta cap a fora del cos del LBD. Un cop s'uneix el lligand l'estructura s'empaqueta més i es produeix un canvi de conformació. En particular cal destacar que l'hèlix 12 seguint el model d'una "trampa per a ratolins" s'empaqueta entre les hèlix 3 i 4 i estableix contactes amb el lligand. Aquest fet permet

que el domini AF-2 pugui interaccionar amb els coactivadors permeten l'activació de la transcripció.

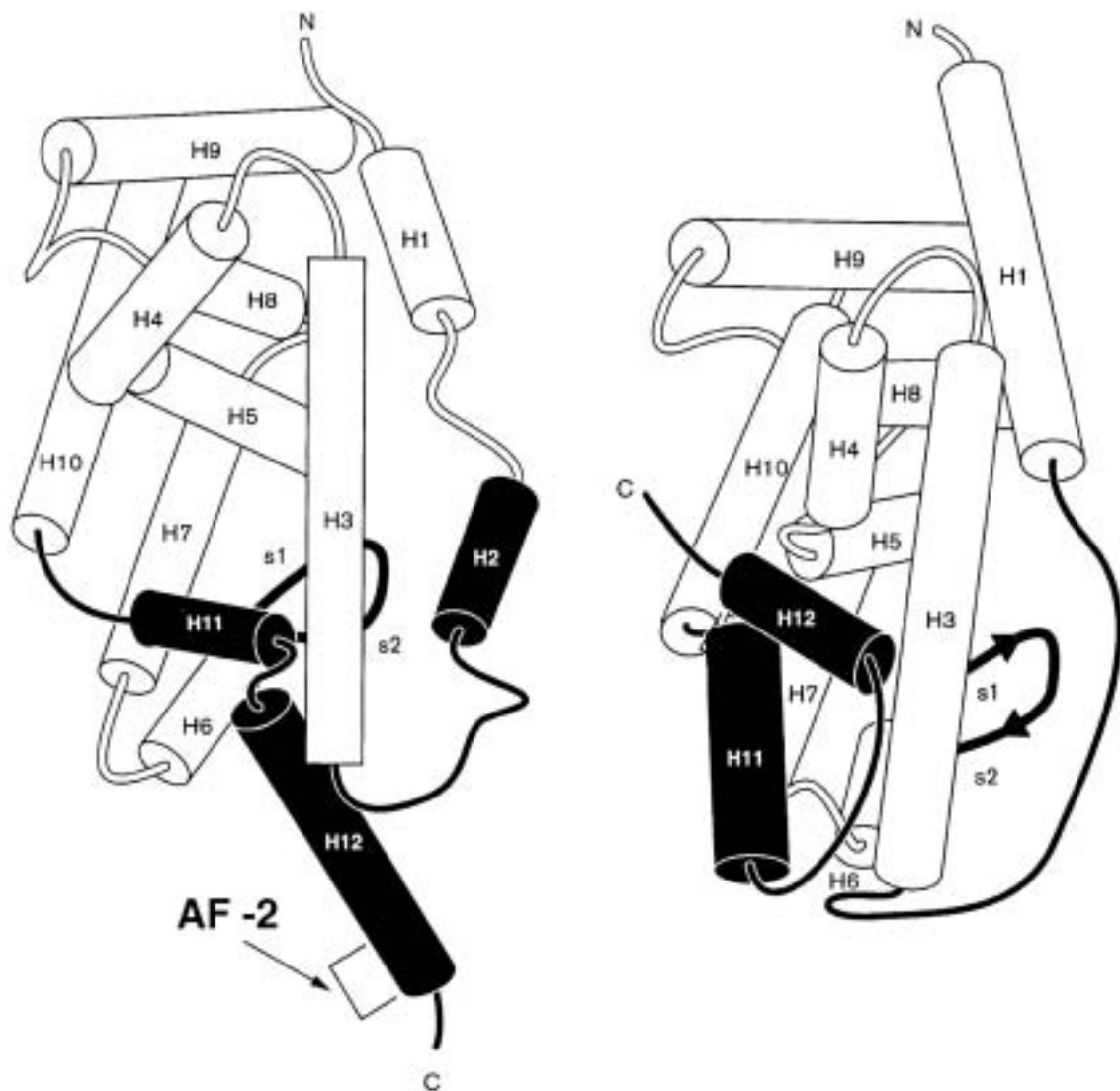


Fig 8. Domini d'unió al lligand. Quan el lligand no està unit al seu receptor nuclear, l'estructura del LBD és menys compacta i l'hèlix 12 on està situat la regió AF-2 es projecta cap en fora. Quan el lligand s'uneix, el LBD pateix un canvi de conformació a conseqüència del qual aquest adquireix una estructura més compacta i l'hèlix 12 passa a ocupar una posició central dins el LBD, permetent així a la regió AF-2 interaccionar amb diferents cofactors. Adaptat d'Aranda A. i Pascual A. 2001.

UNIÓ AL DNA

Els receptors nuclears s'uneixen al DNA a través d'elements de resposta a hormones (*hormone response element*, HRE) presents en els promotors dels gens dianes. Les HREs estan compostes per un nucli consistent en sis parells de bases que tenen una seqüència relativament conservada. La seqüència consens és PuGGTCA, encara que pot haver variacions segons la classe de receptors. La majoria de HRE estan formats per dues seqüències hexamèriques separades per un determinat numero de parells de bases que oscil·la entre 0 i 5, a les quals els receptors nuclears s'uneixen formant dímers. Les HRE poden estar configurades com a palíndroms (Pal), palíndroms invertits (IP) o repeticions directes (DR). Així i tot alguns receptors orfes poden unir-se com a monòmers a una única seqüència hexamèrica, la qual està flanquejada a 5' per una zona rica en A/T.

Homodímers, heterodímers i monòmers

La majoria de receptors nuclears s'uneixen al DNA formant diferents tipus de dímers (Fig. 9). Els receptors d'esteròids s'uneixen al DNA formant homodímers, els quals reconeixen HRE configurats de forma palindròmica. La majoria de receptors nuclears que formen heterodímers els fan usant el RXR com a parella, encara que hi ha alguna excepció (veure més endavant). La majoria d'heterodímers amb el RXR s'uneixen al DNA mitjançant HRE configurats en forma de repeticions directes, on el nombre de nucleòtids que separen els dos nuclis hexamèrics és clau per la discriminació de les seqüències pels diferents heterodímers. En aquest cas hi ha dos tipus d'heterodímers, els permissius i els no permissius. Els heterodímers permissius són aquells que tant el lligand del RXR (el 9-cis RA) com el lligand del receptor "parella" poden induir l'activitat transactivadora del complex, encara que en presència dels dos lligands hi ha un efecte sinèrgic sobre la transactivació. Exemples d'aquests tipus de receptors són PPARs, FXR o Nur77. El cas del LXR és una mica diferent, encara que és un receptor de tipus permissiu, l'estimulació amb 9-cis RA no requereix el domini AF-2 del RXR sinó del LXR. Ho sigui el 9-cis RA provoca un canvi en la conformació del LXR que porta a l'activació transcripcional, aquest procés se'l coneix com a "efecte fantasma" (Willy PJ. i Mangelsdorf DJ. 1997). En canvi, en el cas dels receptors no permissius, tan sols el lligand del receptor "parella" del RXR es capaç d'activar la

transactivació, encara que en presència de 9-cis RA hi ha un augment sinèrgic de la taxa de transcripció, alguns exemples d'aquests receptors són el RAR, el VDR o el TR.

En el cas de la unió al DNA com a monòmer, residus presents en la CTE realitzen unió addicional amb bases presents a 5' de la seqüència hexamèrica de reconeixement per augmentar així l'especificitat de la unió.

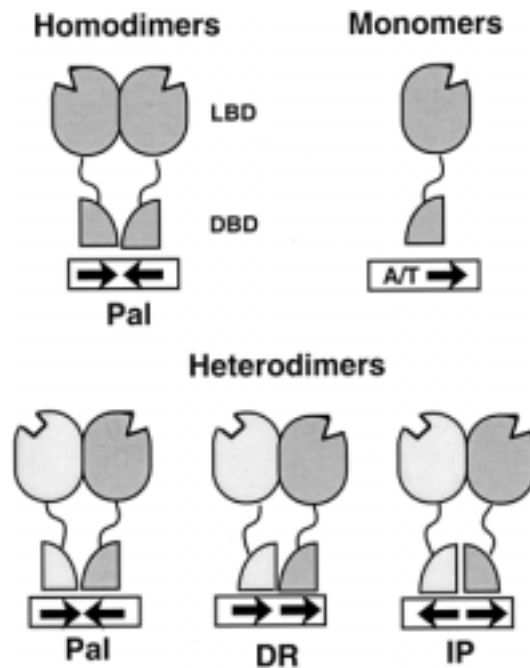


Fig 9. Unió dels receptors nuclears al DNA. Aquesta potser com a homodimers a seqüències palindròmiques, com a monòmers o com a heterodimers. Adaptat d'Aranda A. i Pascual A. 2001

REGULACIÓ DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA PELS RECEPTORS NUCLEARS

Els promotors dels gens transcrits per la RNA polimerasa II (RNA pol II) són reconeguts per dos tipus de factors de transcripció: Els factors de transcripció bàsals (FTB) que interaccionen amb elements del nucli del promotor i amb la RNA pol II i factors de transcripció específics de seqüència, entre els quals estan els receptors nuclears. Aquests últims modulen l'activitat dels FTB regulant així l'expressió gènica. Els receptors nuclears interaccionen amb els FTB mitjançant diferents molècules conegudes com a cofactors, coactivadors i correpressors i d'aquesta manera exerceixen la seva funció com a factors de transcripció.

Coactivadors

Els coactivadors són els responsables d'unir els receptors nuclears amb els cofactors i la maquinària basal de transcripció. Els coactivadors poden interaccionar de diferents maneres amb els receptors nuclears, però principalment ho fan pels dominis AF-1 i AF-2. Els coactivadors poden unir-se al domini AF-1 de manera independent de lligand, encara que procés pot estar regulat per diferents mecanismes com pot ser per fosforilació, en canvi la interacció amb el domini AF-2 depèn de la unió del lligand, Com ja s'ha comentat, quan s'uneix el lligand al receptor canvia la conformació del LBD permeten que els coactivadors puguin unir-se al domini AF-2. Encara que aquest és el paradigma clàssic d'activació dels receptors nuclears, com s'explica més endavant existeixen notables excepcions.

S'han trobat diferents famílies de coactivadors. El primer coactivador que es va identificar va ser SCR-1 (Onate SA. *et al.* 1995), el qual pertany a la família p160. Aquest coactivador interacciona amb els receptors nuclears d'una manera dependent de lligand i del domini AF-2, encara que també s'ha observat que interaccionen amb el domini AF-1 (Alen P. *et al.* 1999, Ma H. *et al.* 1999, Onate SA. *et al.* 1998). Els coactivadors d'aquesta família activarien la transcripció a través de diferents mecanismes, per exemple poden interaccionar amb el cofactor CBP i a més tenen una activitat intrínseca histona acetiltransferasa (HAT).

No tots els coactivadors són proteïnes, s'ha identificat un RNA que també actuaria com un coactivador (Lanz RB. *et al.* 1999). Aquest RNA s'anomena SAR i actuaria a través d'un complex nucleoriboproteïc que interaccionaria amb el domini AF-1.

Cofactors

Els cofactors són proteïnes que uneixen els factors de transcripció dependent de seqüència i els seus coactivadors amb la maquinària basal de transcripció. Un exemple de cofactors àmpliament estudiat són la proteïna d'unió a CREB (*CREB binding protein*, CBP) i el seu paràleg p300. S'ha vist que aquestes proteïnes interaccionen amb diferents factors de transcripció i coactivadors de la família de p160 (Kamei Y. *et al.* 1996). Però a més més d'aquesta funció com a proteïna d'ancoratge (scaffold), CBP/p300 tenen activitat histona acetiltransferasa, amb la qual poden acetilar histones i d'aquesta manera facilitar la transcripció. Una altre histona acetiltransferasa implicada en la transactivació dels receptors nuclears és la proteïna PCAF, aquesta pot

interaccionar amb els receptors nuclears (Blanco JC. *et al.* 1998) així com amb membres de la família de p160 (Korzus E. *et al.* 1998).

Un altre complex proteic que pot actuar com a cofactor és el complex TRAP/DRIP també conegut com a mediador. Està format per unes 14 a 16 proteïnes i pot interaccionar amb els receptors nuclears a través del domini AF-2 de manera dependent de lligand. El complex TRAP/DRIP pot interaccionar amb diferents proteïnes, entre les quals s'ha de destacar la subunitat gran de la RNA pol II. D'aquesta manera, s'ha suggerit que TRAP/DRIP podria actuar reclutant la RNA pol II al promotor del gen diana i d'aquesta manera activar la transcripció.

Correpressors

Hi ha diferents receptors nuclears que en absència del seu lligand actuen com a repressors de la transcripció (Graupner G. *et al.* 1989), es creu que aquest fenomen es deu a que estan associats a diferents proteïnes anomenades correpressors. Els dos primers correpressors que es van descobrir són els que es coneix més bé el seu mecanisme d'acció estan estructuralment relacionats i són el correpressor nuclear (*Nuclear corepressor*, NcoR) (Horlein AJ. *et al.* 1995) i el mediador silenciador per a receptors de retinòic i d'hormona tiroïdal (*silencing mediator for retinoic and thyroid hormone receptors*, SMRT) (Chen JD. i Evans RM, 1995). En condicions en les quals no hi ha lligand, els correpressors estan fortament units als receptors nuclears impedit que el receptor nuclear pugui activar la transcripció. Un cop s'ha unit el lligand, gràcies al canvi de conformació que es produeix, el correpressor perd afinitat per el receptor nuclear i s'allibera.

INTERACCIÓ DELS RECEPTORS NUCLEARS AMB ALTRES VIES DE TRANSDUCCIÓ DE SENYALS

Inicialment els efectes dels receptors nuclears sobre l'expressió gènica es van atribuir al fet que poden unir-se al DNA i d'aquesta manera regulen l'activitat dels promotors dels seus gens dianes. Però ara es sap, que tant important com l'anterior, és la modulació que fan els receptors nuclears sobre diferents vies de transducció de senyals. Les primeres dades varen vindre al descobrir els mecanismes moleculars de l'acció antiinflamatòria i antiproliferativa dels glucocorticòids i dels retinòids. Es va veure que aquest efecte era produït a causa de que aquests receptors nuclears inhibien l'activitat

del factor de transcripció AP-1 (Yang-Yen HF. *et al.* 1990, Schule R. *et al.* 1990). Posteriorment, es va trobar que també podien inhibir l'efecte sobre NF- κ B (Hass RF. *et al.* 1992) o CREB (Chatterjee VK. *et al.* 1991). Aquest paradigma d'acció sembla que està bastant estès entre els receptors nuclears ja que també s'ha vist que entre altres, els PPARs poden inhibir AP-1 (Ricote M. *et al.* 1998, Delerive P. *et al.* 1999). Els mecanismes moleculars implicats poden ser varis i dependre de l'estímul i del tipus de cel·lular (Karin M. i Chang L. 2001). Aquests poden ser: competència per cofactors, interaccions directes, o la inhibició de diferents proteïnes cinases. En tots els casos, és necessari que el receptor nuclear estigui unit al seu lligand, però en una conformació diferent a la que adopta per unir-se al DNA. Aquest fet ha permès en el cas del RAR obtenir lligands sintètics que indueixin la capacitat inhibitoria del receptor nuclear, sense induir la seva capacitat transactivadora, d'aquesta manera es podrien obtenir fàrmacs amb menys efectes secundaris (Fanjul A. *et al.* 1994)

D'altre banda s'ha vist que els receptors d'hormones sexuals indueixen la proliferació i supervivència dels osteoblasts (fet estretament lligat amb la prevenció de l'osteoporosis) activant la via de les MAPK i d'aquesta manera AP-1 (Kousteni S. *et al.* 2001).

Per tant, els receptors nuclears poden modular l'expressió gènica a diferents nivells ja sigui a través de la unió als seus elements de resposta com modulant l'activitat de diferents vies de transducció de senyals. El fet que estiguin regulats per molècules petites i hidrofòbiques (com a mínim la majoria d'ells) fa que sigui relativament fàcil sintetitzar molècules que modulin la seva activitat les quals tenen un ampli ventall d'aplicacions farmacològiques.

NOR-1

El gen receptor nuclear orfe derivat de neurones (*neuron-derived nuclear orphan receptor-1*, NOR-1/MINOR/NR4A3) va ser identificat i clonat per primer cop en neurones en cultiu (Ohkura N. *et al.* 1994) i en limfòcits T activats (Hedvat CV i Irving SG, 1995). Pertany a la família de NGFI-B (NR4A), a la qual també pertanyen els receptors nuclears Nur77/NGFI-B i Nurr1. Aquests tres receptors són orfes i tenen una alta homologia en el seu DBD i moderada en el LBD. La família NR4A està involucrada en diferents funcions: NOR-1 és clau en el desenvolupament embrionari (DeYoung RA. *et al.* 2003), Nurr1 pel desenvolupament de les neurones

dopaminèrgiques (Zetterstrom RH. *et al.* 1997), NOR-1 i Nur77 en l'apoptosi de timòcits en la selecció positiva (Cheng LE. *et al.* 1997, Woronicz JD. *et al.* 1994), a més a més aquests dos gens modulen la proliferació en diferents tipus cel·lulars (Ponniot *et al.* 2002, Kolluri SA. *et al.* 2003).

A més a més d'una possible regulació per un lligand desconegut i com s'explicarà més a endavant possiblement inexistent, hi ha diferents mecanismes per regular l'activitat d'aquest receptors. Tant NOR-1 com Nur77 són gens de resposta primerenca per a diferents factors de creixement, de tal manera, que la seva activitat es podria regular per variacions en la quantitat de proteïna. També s'ha observat que l'activitat de Nur77 pot ser regulada per fosforilacions en el domini N-terminal. El fet que aquest domini sigui molt divergent entre els membres de la família NGFI-B no permet hipotetitzar si NOR-1 també està regulat per aquest mecanisme.

Unió al DNA

Els membres de la família NGFI-B poden unir-se al DNA de diferents maneres. El primer mecanisme trobat va ser la unió de forma monomèrica a l'element de resposta a NGFI-B (*NGFI-B response element*, NBRE) (Wilson TE. *et al.* 1991) Aquest està format per 8 bases que són la seqüència hexamèrica típica dels receptors nuclears precedida de dues adenines. En aquest cas, per establir la unió de la proteïna al DNA, es requereixen a més a més de la caixa P, residus de la CTE. Més recentment es va trobar que els membres de la família NGFI-B poden unir-se al DNA formant homodímers i heterodímers entre ells als elements de resposta per a Nur77 (*Nur77 response element*, NuRE) (Philips A. *et al.* 1997, Maira M. *et al.* 1999). Aquests elements de resposta estan compostats per dues seqüències NBRE situades entre elles en forma de palíndrom invertit amb 6 nucleòtids espaiadors (IP-6). A més a més tant Nur77 com Nur1, però no NOR-1 poden formar heterodímers amb el RXR unint-se a repeticions directes amb 5 nucleòtids espaiadors (DR5) (Zetterström RH. *et al.* 1996). En aquest cas, el RXR és una parella permissiva, ho sigui la presència del 9-cis RA és suficient per activar la transcripció.

Estructura gènica i proteica de NOR-1

En el genoma humà, el gen que codifica per NOR-1 està situat en el cromosoma 9q22, està constituït per 8 exons i té una estructura exons-introns semblants a la trobada per altres receptors nuclears (Ohkura N. *et al.* 1996). Sembla que podrien haver

diferents isoformes de NOR-1 per empalament (*splicing*) diferencial (Ohkura N. *et al.* 1997) (Fig 10). NOR-1 α' es diferenciaria de NOR-1 α per tindre un exò 3 més llarg (exò 3B), però aquest fet no afectaria a la seqüència de la proteïna, ja que l'inici de traducció està situat a la part comuna d'aquest exò. Les altres dues variants vindrien a partir de variants en l'exò 5. En el cas d'usar l'exò 5B (isoforma β) es tindria una proteïna truncada a l'aparèixer en la seqüència del missatger una senyal prematura d'aturada de la traducció, aquest fet faria que aquesta proteïna no tingués LBD. Aquesta possible proteïna no s'ha trobat en el cas NOR-1 encara que s'ha identificat el seu cDNA corresponent en una llibreria de cDNA de múscul esquelètic (Labelle Y. *et al.* 1995). En el cas de Nurrl, la corresponent proteïna paràlega, actua com a dominant negatiu (Ohkura N. *et al.* 1999), possiblement perquè pot unir-se al DNA però al no tindre LBD no pot transactivar.

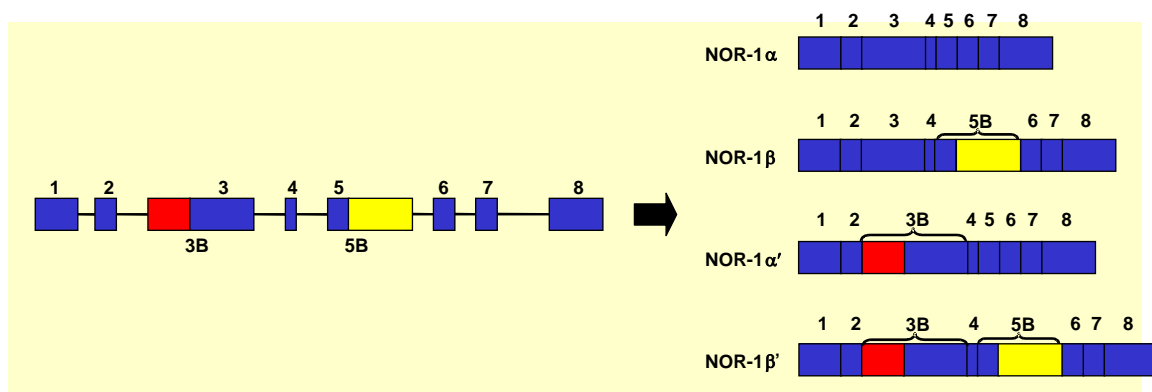


Fig 10. Esquema dels diferents transcrits que es poden generar a partir del gen de NOR-1 per empalament diferencial que pot patir NOR-1. El gen NOR-1 pot generar 4 isoformes per empalament diferencial.

Com ja s'ha comentat, en la majoria de receptors nuclears el domini AF-2 present en el LBD és clau per la unió a diferents coactivadors. En el cas de NOR-1 i Nur77 però, sembla que no segueixen aquest paradigma. Sorprenentment, tant en el cas de NOR-1 com en el cas de Nur77, el LBD interacciona de forma feble amb diferents coactivadors (Wansa KD. *et al.* 2003, Wansa KD. *et al.* 2002). Sembla ser que la interacció amb coactivadors, en especial de la família de p160, es produeix a través del domini AF-1 situat en l'extrem N-terminal. Aquest domini també pot reclutar altres cofactors típics de receptors nuclears com CBP o elements del complex DRIP/TRAF. A més a més, la unió de p160 a AF-1 promou una unió intramolecular amb el LBD, fet que podria estabilitzar el complex receptor-coactivadors.

L'explicació d'aquesta divergència en el mecanisme de regulació amb altres receptors nuclears sembla que recau en un canvi en la topologia del domini AF-2 d'aquestes proteïnes. En estudis de modelatge molecular en NOR-1 i Nur77 (Wansa KD. *et al.* 2003, Wansa KD. *et al.* 2002), així com per l'anàlisi cristal·logràfic amb raig X sobre l'ortòleg de la família en *Drosophila*, DHR 38 (Baker KD. *et al.* 2003), s'ha observat que la topologia del LBD no permet la correcta interacció amb els cofactors. A diferència del que passa amb la majoria de receptors nuclears els quals posseeixen un solc hidrofòbic en el domini AF-2 necessari per la interacció amb els coactivadors, en la família NR4A hi ha diferents residus hidrofílics que trenquen la continuïtat del solc.

A més a més sembla que DHR 38 té una butxaca d'unió al lligand bastant peculiar i sembla que poc funcional. L'espai de la butxaca en aquest receptor està ocupada per les cadenes laterals de 4 fenilalanines que pràcticament ocupen tot l'espai deixant tant sols un volum d'uns 30 \AA^3 , el qual és massa petit per permetre la unió de cap molècula orgànica. A més a més realitzant càlculs de mecànica quàntica es pot comprovar que 3 de les 4 fenilalanines estan en la única conformació de baixa energia possible mentre l'altre sols es pot moure en un pla abans de trobar barreres estèriques significants. Per tant no sembla que fàcilment puguin deixar lliure un espai prou gran per acomodar un hipotètic lligand. A més a més en la majoria de receptors nuclears existeix un residu d'arginina altament conservat que ajuda a ancorar de forma correcta el lligand al receptor nuclear, en aquest cas el residu està conservat però està encarat cap el solvent. Totes aquestes dades suggereixen que el receptor DHR 38 no té cap lligand o com a mínim cap segons el model estàndard del receptors nuclears, encara que tampoc es pot descartar que alguna interacció de tipus al·lostèric provoqués un canvi de conformació que permetés acomodar el lligand. El fet que aquest receptor tingui una significativa homologia amb NOR-1 en el LBD i en concret estiguin conservades les 4 fenilalanines que ocupen la butxaca d'unió al lligand juntament al fet que el LBD de NOR-1 no pugui unir-se als cofactors "clàssics" dels receptors nuclears fan hipotetitzar que NOR-1 no tingués tampoc cap lligand.

MECANISMES DE TRANSDUCCIÓ DE SENYALS

Les cèl·lules responen a les alteracions de l'ambient o a senyals provinents d'altres cèl·lules a través de diferents mecanismes entre els qual destaquen canvis en l'expressió gènica. Aquest procés està mitjançat per diferents mecanismes de transducció de senyals, els quals permeten transformar una senyal extra o intracel·lular en l'activació/repressió de diferents factors de transcripció que són qui en últim terme regulen el transcriptoma (Fig. 12). Aquest mecanisme pot ser aparentment simple, com en el cas de molts receptors nuclears, els quals s'activen a l'unir-se el seu lligand. Però en molts altres casos, entre els qual també hi ha diferents receptors nuclears com NOR-1, aquest mecanisme és més complex i participen diferents vies o millor dit xarxes de transducció de senyals.

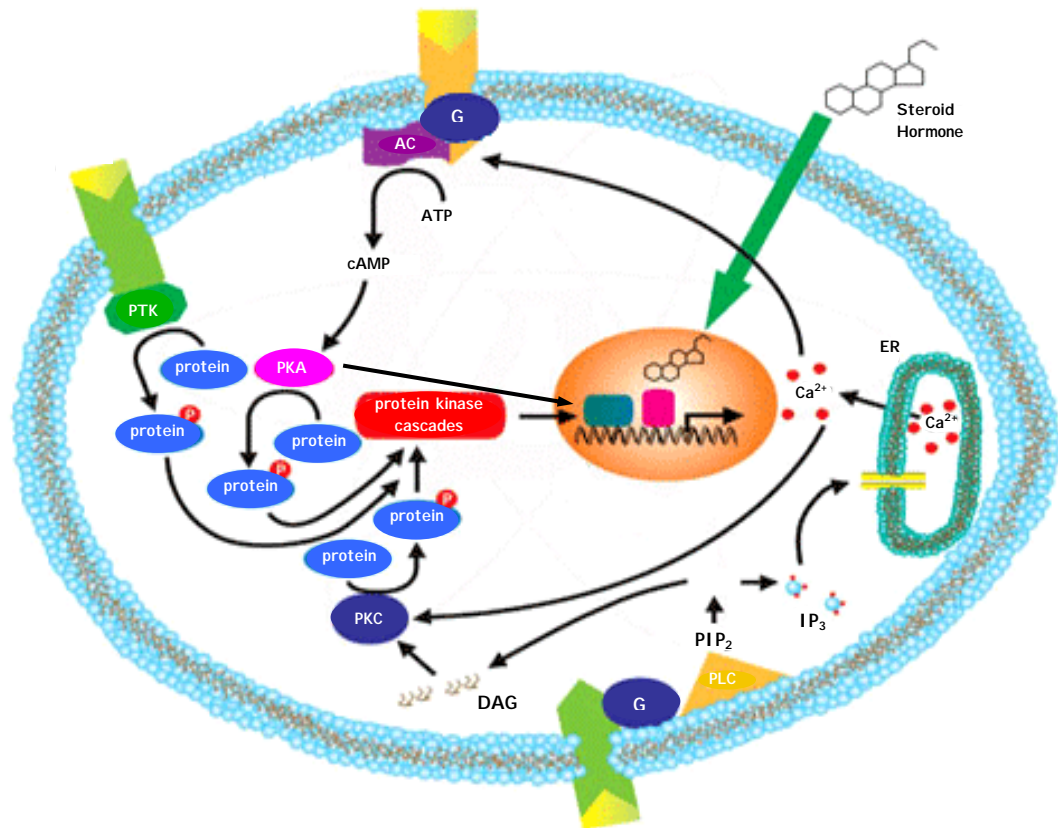


Fig 12. Esquema de diferents vies de transducció de senyals. Existeixen diverses vies de transducció de senyals que s'inicien per l'activació de diferents receptors de la membrana plasmàtica, entre els quals es poden destacar els receptors acoblats a proteïnes G (GPCRs) i els receptors proteïna tirosina cinases (PTK). Un cop s'han activat, les proteïnes G poden induir la producció de diferents segons missatgers com cAMP mitjançant l'activació de l'adenilat ciclasa o de diacilglicerol (DAG) i IP_3 a través de l'activació de la fosfolipasa C. Aquests segons missatgers poden a la seva vegada activar a diferents efectors entre els quals destaquen la PKA o la PKC, així com produir un augment del calci citosòlic. Finalment s'activaran de manera seqüencial altres proteïnes permeten en últim terme modular l'activitat de diferents factors de transcripció, els quals activant d'aquesta manera diferents cassets d'expressió gènica.

PROTEÏNES G HETEROTRIMÈRIQUES

Moltes senyals que reben les cèl·lules tant endocrines com paracrines o autocrines estan basades en la unió de la molècula senyalitzadora a receptors presents en la membrana plasmàtica. Aquests receptors tenen associada alguna activitat que els hi permet transduir la senyal. Aquesta activitat pot ser enzimàtica com els receptors amb activitat tirosina o serin-treonina cinases, lligada a l'obertura d'algun canal iònic o regular l'activitat de proteïnes G heterotrimèriques. Els receptors amb aquesta propietat s'anomenen receptors acoblats a proteïnes G (*G-protein coupled receptors*, GPCRs) i pertanyen a una superfamília de receptors caracteritzats per tindre 7 hèlix transmembrana i una ampla gamma de lligands depenent de quin receptor es tracti. Es poden citar, entre d'altres, el receptor de trombina, o de lípids bioactius com el cas de la SIP. Un cop aquests receptors uneixen al seu lligand poden activar a diferents proteïnes G les quals poden a la seva vegada activar o inhibir un ampli ventall de vies de transducció de senyals.

Les proteïnes G estan constituïdes per 3 subunitats α , β i γ , encara que funcionalment les dues últimes es consideren de forma conjunta ($\beta\gamma$).

Quan els GPCRs són activats, es promou la seva interacció amb les proteïnes G, permeten l'intercanvi del GDP present en la subunitat α per GTP (HammHE. 1998). Aquest fet comporta un canvi conformacional en la proteïna que promou la seva dissociació entre la subunitat $G\alpha$ per una banda i la $G\beta\gamma$ per l'altre, les quals activaran a diferents efectors.

Les subunitats $G\alpha$ es classifiquen en 4 famílies:

G_s : Aquestes proteïnes activen a l'adenilat ciclasa (AC) enzim responsable de la producció de l'adenosin-3'-5'-monofosfat cíclic (cAMP), encara que s'ha trobat que també poden modular l'activitat de diferents canals iònics.

G_i : Poden inhibir l'activitat d'algunes isoformes d'AC. També poden modular diferents canals iònics així com fosfodiesterases de nucleòtids cíclics. Les proteïnes membres d'aquesta família, excepte $G\alpha_z$, són inhibides per la toxina bacteriana pertússica (PTX), la qual promou l'ADP-ribosilació de la subunitat α (Ui M. i Katada T. 1990).

G_q : Regulen l'activitat de la fosfolipasa C_β (PL- C_β). Aquest enzim hidrolitza el fosfatidil inositol-4-5-bifosfat (PIP₂) per generar dos missatgers secundaris, l'inositol 1,4,5-trifosfat (IP₃) i diacilglicerol (DAG). L'IP₃ promou un augment en els nivells

citòsòlics de calci a través de l'obertura de canals de calci del reticle endoplasmàtic mentre que el DAG induïx l'activació de diferents proteïnes cinases C (PKC).

G₁₂: Poden regular l'activitat de diferents proteïnes G petites.

A més a més de les senyals mitjançades per la subunitat G α , el dímer $\beta\gamma$ també es capaç de regular diferents efectors. Existeixen 6 tipus de subunitats β i 12 γ els quals poden combinar-se de diferent manera per formar els dímers. Entre altres efectes i depenent del dímer, poden activar o inhibir l'AC, modular diferents canals iònics, estimular diferents PL-C β , així com promoure l'activació de la proteïna tirosina cinasa citosòlica Src i de diferents cinases depenents de fosfoinositol-3-fosfat (*phosphatidylinositol-3 kinase*, PI3K).

Així a través de l'activació de diferents proteïnes G es pot activar un ampli ventall de vies de transducció de senyals, les quals en molts casos acabaran regulant diferents proteïnes cinases.

PROTEÏNES CINASES

Les proteïnes cinases són enzims que catalitzen l'addició d'un grup fosfat de l'ATP a una altre molècula. Poden actuar sobre glúcids, lípids o proteïnes. En aquest últim cas hi ha dos tipus de proteïnes cinases, les proteïna serin-treonina cinases, les quals fosforilen a residus de serina o treonina com poden ser la PKA o la PKC i les proteïnes tirosina cinases que fosforilen residus de tirosina com el receptor del PDGF o Src.

Proteïna cinasa A

La proteïna cinasa A (*protein kinase A*, PKA) o proteïna cinasa dependent de cAMP és una cinasa l'activitat de la qual s'indueix per cAMP (Walsh *et al.* 1968). En condicions bassals, aquesta proteïna és inactiva formant un tetràmer constituït per dues subunitats reguladores (R) i dues catalítiques (C). En el moment que augmenten els nivells de cAMP aquest s'uneix a les subunitats R provocant un canvi conformacional la conseqüència del qual es que les subunitats C perden afinitat per les R i es dissocien quedant en una forma catalíticament activa (Kopperud R. *et al.* 2003).

A més a més d'aquest mecanisme d'activació, també s'ha observat que la subunitat C pot estar de forma inactiva unida al complex NF- κ B-I κ B, quan aquest

s'activa per degradació d'I κ B, la subunitat C esdevé activa sent aquest un mecanisme d'activació independent del cAMP (Zhong H *et al.* 1997).

La PKA té nombrosos substrats com diferents enzims claus en el metabolisme energètic així com diferents factors de transcripció com CREB.

Proteïna cinasa C

La proteïna cinasa C (*Protein kinase C*, PKC) és una família de serin-treonina cinases les quals estan regulades per diferents estímuls cel·lulars. Segons la seva estructura primària i els mecanismes de regulació es poden classificar en 4 grups (Toker A. 1998):

PKC convencionals (cPKC): Està format per PKC α , PKC β I i PKC β II i PKC γ . Per activar-se necessiten unir-se a DAG, calci i fosfatidilserina (PS).

PKC noves (nPKC): Està format per PKC δ , PKC ϵ , PKC η PKC θ . També necessiten, per la seva activació unir-se a DAG i PS, però no a calci.

PKC atípiques (aPKC): Està format per PKC ζ i PKC λ . Per la seva activació no necessiten ni DAG ni calci, però si PS. En la seva regulació poden intervindre altres molècules lipídiques com en el cas de la PKC ζ que es regula per productes de la PI3K o per ceramida.

PKC μ : També coneguda com a PKD. Igual que les aPKC no es regula ni per DAG ni per calci, però necessita PS.

A més a més de diferents segons missatgers lipídics per ser actives totes les PKC han de ser fosforilades en el domini catalític d'una manera similar al que passa amb altres proteïnes cinases. Una de les possibles PKC cinases podria ser la proteïna cinasa dependent de fosfoinositòids-1 (*phosphoinositoid-dependent kinase-1*, PDK-1) (Chou MM. *et al.* 1998, Dutil EM. *et al.* 1998), la qual també està involucrada en l'activació d'altres cinases com la proteïna cinasa B (*protein kinase B*, PKB/Akt) o la cinasa p70^{Sr6}. Les diferents PKC poden fosforilar proteïnes involucrades en múltiples processos cel·lulars com ara la proliferació i la migració, com poden ser proteïnes reguladores de la MAPK com Raf.

Via de les MAPK

Les proteïnes cinases activades per mitògens (*mitogen-activated protein kinases*, MAPK) són un família de serin-treonina cinases que regulen diversos processos cel·lulars claus com poden ser la proliferació, la migració o l'apoptosi (Pearson G. *et al.* 2001). Les MAPK tenen característiques comunes amb les cinases dependents de ciclins, encara que la principal diferència és que en el cas de les MAPK, aquestes són directament activades per fosforilació sense necessitat de tindre una subunitat reguladora. Generalment, les MAPK necessiten per la seva activació ser fosforilades en un residu de treonina i una altre de tirosina separades per un residu variable (TXY). L'activació de les MAPK es produeix per una cascada de fosforilacions consecutives, en les quals intervenen com a mínim dues cinases més. Les MAPK cinases s'anomenen MKK són unes cinases característiques ja que tenen a l'hora un domini serin-treonina cinasa i un altre tirosina cinasa, fet que els permet activar a les MAPK. A la seva vegada les MKK són regulades per fosforilació per les MKK cinases (MKKK). Aquest conjunt de tres cinases formen mòduls funcionals independents (Fig 13) els quals responen a diferents estímuls (Johnson G i Lapadat R, 2002).

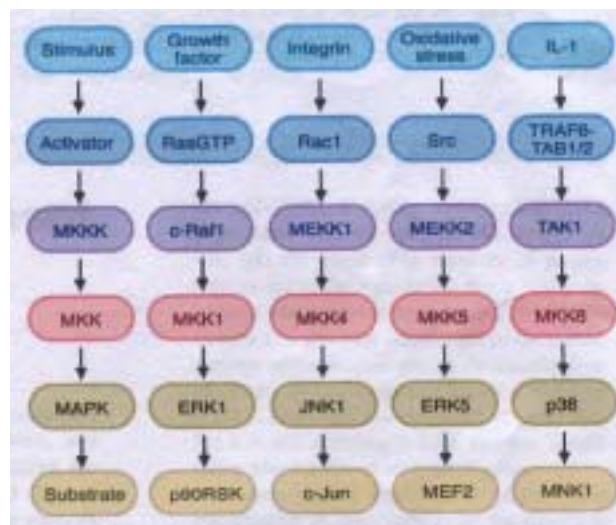


Fig 13. Esquema dels mòduls de MAPK. Els mòduls de les MAPK estan constituïts per tres proteïnes cinases que es fosforilen i activen de manera seqüencial davant d'un gran ventall d'estímuls. A la seva vegada les MAPK poden regular un ampli nombre de processos cel·lulars. Adaptat de Johnson G i Lapadat R. 2002

A la seva vegada les MKKK poden estar regulades per diferents efectors com altres protein cinases (les quals serien MKKKK) o proteïnes G petites com ara Ras, entre d'altres mecanismes. A la seva vegada existeixen diferents proteïnes fosfatases que poden desactivar a les diferents cinases de la via. Aquestes poden ser serin-treonina fosfatases, tirosina fosfatases així com una fosfatasa dual que pot desfosforilar les MAPK tant el seu residu de treonina com el de tirosina. Encara que aquesta podria semblar la fosfatasa més efectiva, la desfosforilació de tan sols un residu, tant el de treonina com el de tirosina ja és suficient perquè la MAPK perdi tota la seva activitat.

Encara que sembla que existeix una certa linealitat en la transducció de senyals en els diferents mòduls de MAPK, sobretot en el pas MKK-MAPK, també existeixen múltiples punts d'entrecruament, entre els diferents vies de MAPK sobretot a nivell de MKKK, ja que aquests enzims poden fosforilar MKK de diferents mòduls i d'aquesta manera augmentar la complexitat del sistema.

Les MAPK es poden dividir en diferents famílies:

Cinases regulades per estímuls extracel·lulars (*extracellular-stimulus regulated kinases, ERK*): Està formada per dos membres ERK-1/p44MAPK i ERK-2/p42MAPK. Són activades per diferents factors de creixement i senyals mitogèniques. Juguen un paper clau en el cicle cel·lular, fosforilant i activant diferents factors de creixement com el factor de resposta al sèrum (*serum response factor, SRF*) o altres proteïnes cinases com Rsk.

N-Terminal Jun cinasa/Proteïn-cinases activades per estrès (*jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinases, JNK/SAPK*): Està formada per tres proteïnes JNK1, JNK2 i JNK3 les quals tenen diferents variants per empalmament alternatiu. Són activades per diferents citocines, alguns lligands de GPCRs i per diferents senyals d'estrès com substàncies que interfereixen en la síntesis de DNA i proteïnes.

p38 MAPK: Està composta per 4 gens que poden presentar diferents proteïnes per empalmament alternatiu. Són activades per diferents citocines, lligands de GPCRs i per diferents senyals d'estrès com estrès tèrmic o osmòtic.

A més a més d'aquestes famílies de MAPK que són les més ben estudiades, existeixen d'altres com l' ERK 3, aquesta MAPK s'activa per fosforilació en un residu de serina en el context SEG i a diferència d'altres MAPK no es necessita ser fosforilada en un residu de tirosina.

CREB

La proteïna d'unió als elements de resposta al cAMP (*cAMP response element binding protein*, CREB) és un factor de transcripció que pot ser activat per diferents estímuls (Mayr B i Montminy M. 2001), entre els quals es pot destacar, a més a més del cAMP com el seu nom indica, diferents factors de creixement, increments citosòlics de calci, senyals provinents d'integrines o a la llum ultraviolada. CREB forma part d'una família de factors de transcripció en la qual també figuren CREM i ATF-1 i ATF-2. Aquestes proteïnes tenen una estructura semblant, composta per un domini central anomenat domini induïble per cinases (*kinases inducible domain*, KID) el qual té un residu de serina susceptible de ser fosforilat per diferents proteïnes cinases. Flanquejant a aquest domini ens trobem dos dominis hidrofòbics rics en glutamina anomenats Q1 i Q2, finalment en el domini C-terminal es troba un domini bàsic amb cremallera de leucina (bZIP) el qual es responsable de la unió al DNA i de la dimerització.

Aquestes proteïnes es poden unir al DNA com a monòmers o dímers a unes seqüències anomenades elements de resposta a cAMP (*cAMP response element*, CRE) (Montminy M. *et al.* 1986, Comb M. *et al.* 1986, Short JM. *et al.* 1986). CRE està constituït per una seqüència palindròmica octamèrica on en principi CREB s'uneix com a dímer, encara que també s'han trobat nombrosos gens on sols està present la meitat del palíndrom, aquest mig element de resposta també es funcional encara que sembla que és menys potent.

CREB està de forma constitutiva unit al DNA ja que la concentració nuclear de CREB és molt més alta que la constant de dissociació pel seu element de resposta i a més a més la seva fosforilació no altera l'afinitat pel DNA (Hagiwara M. *et al.* 1993). L'activitat de CREB es regula per fosforilació en la serina 133 (Gonzalez GA. i Montminy M. 1989) situada en el domini KID. Encara que la primera proteïna cinasa que podia fosforilar a CREB va ser la PKA, actualment es sap que pot ser fosforilat per diferents cinases com proteïnes cinases dependents de calci-calmodulina II/IV (*calcium, calmodulin dependent kinases II/IV*, CaMK II/IV), p38 MAPK, o la Rsk entre altres.

Un cop CREB és fosforilat en la serina 133, es produeix un canvi conformacional que li permet unir-se al cofactor CBP (Chrivia JC. *et al.* 1993). CBP, com ja s'ha explicat anteriorment, és un cofactor el qual pot activar la transcripció a diferents nivells ja que pot servir de proteïna d'ancoratge per la maquinària basal de

transcripció a més a més de posseir una activitat histona acetiltransferasa (HAT). En el cas concret de CREB l'acetilació de les histones suposa un augment del temps en que CREB està fosforilat (Michael LF *et al.* 2000) i per una altre banda, també s'ha observat que CBP pot directament acetilar a CREB (Lu Q. *et al.* 2003) fet que augmenta l'activitat transcripcional de CREB.

Encara que sembla que de forma general l'acetilació d'histones afavoreix la transcripció (Kornberg RD. i Lorch Y. 1999), recentment s'ha observat en llevats (Bernstein BE. *et al.* 2000) i cèl·lules de mamífer (Rasclé A. *et al.* 2003, Xu M. *et al.* 2003) que en l'expressió d'alguns gens es necessari la presència d'activitat histona deacetilasa (HDAC) per la seva expressió. En el cas de gens regulats per CREB sembla que dependria de cada promotor però, en alguns gens com NOR-1 s'ha trobat que inhibidors de l'activitat HDAC inhibirien la transcripció dependent de CREB (Fass DM. *et al.* 2003).

CREB és un factor de transcripció involucrat en nombrosos processos cel·lulars, a l'actualitat es coneixien més de 100 gens regulats per CREB. Encara que el grup més nombrós correspon a gens relacionats amb el metabolisme energètic, CREB també regula l'expressió de gens implicats en altres processos cel·lulars com la proliferació o l'apoptosi.

Per tant CREB pot representar un punt de convergència de diferents vies de transducció de senyals permeten l'expressió de determinats gens segons les necessitats de la cèl·lula.

En el desenvolupament de la patologia ateroscleròtica estan involucrats diferents tipus cel·lulars com les CML. Actualment es coneixen diferents mecanismes moleculars implicats en l'activació d'aquestes cèl·lules a la paret vascular, però encara es desconeixen molts dels elements claus d'aquest procés.

En el nostre laboratori recentment s'havia identificat el gen NOR-1, com un gen que s'indueïa ràpidament en CML estimulades amb sèrum. Per tal de caracteritzar tan el seu mecanisme d'expressió com el seu paper en l'activació de les CML, ens vam plantejar realitzar aquesta tesis amb els següents objectius:

- **Analitzar l'expressió de NOR-1 en les CML sota l'estímul de diferents factors de creixement i LDL.**
- **Analitzar els mecanismes de transducció de senyals implicats en l'expressió de NOR-1 en CML.**
- **Analitzar el paper de NOR-1 en la proliferació de les CML així com en un model *in vitro* de reparació tisular.**

En el desenvolupament de la patologia ateroscleròtica estan involucrats diferents tipus cel·lulars com les CML. Actualment es coneixen diferents mecanismes moleculars implicats en l'activació d'aquestes cèl·lules a la paret vascular, però encara es desconeixen molts dels elements claus d'aquest procés.

En el nostre laboratori recentment s'havia identificat el gen NOR-1, com un gen que s'indueïa ràpidament en CML estimulades amb sèrum. Per tal de caracteritzar tan el seu mecanisme d'expressió com el seu paper en l'activació de les CML, ens vam plantejar realitzar aquesta tesis amb els següents objectius:

- **Analitzar l'expressió de NOR-1 en les CML sota l'estímul de diferents factors de creixement i LDL.**
- **Analitzar els mecanismes de transducció de senyals implicats en l'expressió de NOR-1 en CML.**
- **Analitzar el paper de NOR-1 en la proliferació de les CML així com en un model *in vitro* de reparació tisular.**

Neuron-Derived Orphan Receptor-1 (NOR-1) Modulates Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation

José Martínez-González, Jordi Rius, Ana Castelló, Claudia Cases-Langhoff, Lina Badimon

Abstract—Vascular smooth muscle cells (VSMCs) migration and proliferation play a key role in the pathophysiology of cardiovascular disease. However, the transcription factors that regulate VSMC activation are not completely characterized. By a mRNA-differential display approach, we have identified neuron-derived orphan receptor-1 (NOR-1), a transcription factor within the NGFI-B subfamily of nuclear receptors, as a immediate-early gene in VSMCs. Two NOR-1 isoforms (α and β) were identified and cloned from serum-induced porcine VSMC that shared high homology with the human isoforms. Northern blot analysis revealed a strong and transient (1 to 6 hours) upregulation of NOR-1 in both porcine and human coronary SMCs by growth factors (serum, platelet-derived growth factor-BB, and epidermal growth factor) and α -thrombin but not by cytokines. NOR-1 upregulation is processed through G protein-coupled receptors and tyrosine kinase receptors, and involves Ca^{2+} mobilization, protein kinase C activation, and the mitogen-activated protein kinase pathway. This induction was closely dependent of the cAMP response elements present in NOR-1 promoter as transfection assays indicate. Human coronary atherosclerotic lesions overexpress NOR-1, and balloon angioplasty transiently induces NOR-1 in porcine coronary arteries with a pattern similar to that observed in VSMCs in culture. Antisense oligonucleotides against NOR-1 inhibited human coronary SMC proliferation (reduced de novo DNA synthesis, cell cycle progression, and VSMC wound repair) as efficiently as antisense against the protooncogene *c-fos*. These results show that NOR-1 modulates VSMC proliferation, and suggest that this transcription factor may play a role in both spontaneous and accelerated atherosclerosis. (*Circ Res.* 2003;92:96-103.)

Key Words: smooth muscle cells ■ NOR-1 ■ atherosclerosis ■ angioplasty ■ gene expression

The understanding of the molecular mechanisms involved in vascular smooth muscle cell (VSMC) activation and differentiation requires an accurate mapping of the cascade of transcription factors induced by atherogenic stimuli. These master genes could be targets for new diagnosis and/or therapeutic strategies. Recently, different nuclear receptors, including peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs),^{1,2} retinoid receptors, both retinoid X receptors (RXR) and retinoic acid receptors (RAR), and retinoid-related orphan receptors (ROR) have been identified in VSMC activation/proliferation and consequently have been implicated in the atherogenic process.³⁻⁵ Nuclear receptors comprise a large family of ligand-activated transcription factors that by regulating complex gene programs play critical roles in nearly all aspects of development and adult physiology.^{6,7} Moreover, currently, ligands have been identified for only half of the known nuclear receptors; the remaining receptors known as orphan nuclear receptors constitute a promising area especially for research and development.

In the present study, we have identified by mRNA-differential display (mRNA-DD) analysis neuron-derived orphan receptor-1 (NOR-1) as an early-response gene in VSMCs. NOR-1, together with Nur77 and Nurr1, form the NGFI-B family of orphan nuclear receptors within the ste-

roid/thyroid receptor superfamily.^{6,7} These genes have been involved in neuroendocrine regulation, neural differentiation, liver regeneration, cell apoptosis, and mitogenic stimuli in different cell types.⁸ We observed a strong induction of NOR-1 in VSMCs by growth factors and thrombin. NOR-1 was upregulated through signaling pathways commonly activated in cell migration and proliferation. NOR-1 and Nur77 were overexpressed in atherosclerotic lesions from patients with coronary artery disease (CAD) and balloon angioplasty transiently induces NOR-1 in porcine coronary arteries. Moreover, antisense oligonucleotides against NOR-1 significantly inhibited VSMC proliferation and wound repair. These results suggest that NOR-1 may play a role in the molecular mechanisms underlying both spontaneous and accelerated atherosclerosis.

Materials and Methods

SMC Cultures

VSMCs were obtained by a modification of the explant technique from swine and human coronary arteries.⁹ Cells were cultured as described previously, and those used in the experiments were between the 2nd and 5th passage. Cells were seeded in multiwell plates and, at confluence, were arrested with medium containing

Original received August 5, 2002; revision received November 21, 2002; accepted November 26, 2002.

From the Instituto de Investigación Cardiovascular de Barcelona, CSIC-ICCC-Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain.

Correspondence to Prof Lina Badimon, Instituto de Investigación Cardiovascular de Barcelona, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Avda. Sant Antoni Maria Claret No. 167, 08025 Barcelona, Spain. E-mail lbadimov@cid.csic.es

© 2003 American Heart Association, Inc.

Circulation Research is available at <http://www.circresaha.org>

DOI: 10.1161/01.ES.0000050921.53008.47

0.4% fetal calf serum (FCS) for 48 hours. Arrested cells were stimulated with either 10% human serum or 5 nmol/L platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) (Amersham-Pharmacia), 10 U/mL α -thrombin (Diagnostica Stago), 10 nmol/L insulin-like growth factor-1 (IGF-I) (Sigma), 1 μ mol/L insulin (Novo Nordisk), 10 nmol/L epidermal growth factor (EGF) (Amersham-Pharmacia), 25 nmol/L basic fibroblast growth factor (bFGF) (Amersham-Pharmacia), 5 nmol/L tumor necrosis factor- α (TNF- α) (Amersham-Pharmacia), 5000 U/mL interleukin-1 β (IL-1 β) (Amersham-Pharmacia), 0.1 nmol/L transforming growth factor- β (TGF β) (Amersham-Pharmacia), or increasing concentrations of A23187 (Alexys) and 4- β -phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) (Sigma) in different experiments. When inhibitors were used, SMCs were preincubated with them for 30 minutes before stimulus. The inhibitors used were 1 μ g/mL pertussis toxin (Sigma), 50 μ mol/L PD98059 (Sigma), 15 μ mol/L 1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethano-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid tetrakis acetoxy methyl ester (BAPTA) (Sigma), or increasing concentrations of GF-109203X (Sigma) or EGTA.

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

mRNA-DD Analysis

Total RNA from porcine coronary tunica media SMCs either arrested or stimulated for 1 hour with 10% human serum, 10 U/mL α -thrombin, or 5 nmol/L PDGF-BB was isolated using QuickPrep (Amersham-Pharmacia). mRNA-DD analysis was performed with the Delta RNA Fingerprinting kit (Clontech) as described.¹⁰ Differentially displayed bands were cloned into the pGEM-T vector (Promega) and sequenced with the ABIPrism dRhodamine Terminator Cycle Sequencing kit (Perkin Elmer).

Screening of cDNA Libraries

Band 2 identified by mRNA-DD was used as a probe in the analysis of cDNA libraries in λ ZAPII (Stratagene) prepared from porcine coronary SMCs (stimulated with human serum for 1 hour) mRNA. Positive clones (101) were isolated in a screening (1×10^6 plaques) and were characterized by restriction-enzyme mapping. Clones λ SsNor32 and λ SsNor83 were subcloned for further analysis. Nucleotide sequence was obtained by automatic sequencing of both cDNA strands. Multiple protein sequence alignments were performed using the ClustalW service at European Bioinformatics Institute.

Northern Blot Analysis

Total RNA was obtained as indicated above and was analyzed by Northern blot as described.⁹ NOR-1 α cDNA, a rat *c-fos* cDNA, and a ribosomal cDNA (to normalize blots) were used as probes.

Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Nuclear extracts (3 μ g) from human VSMCs and doubled stranded probes corresponding to the sequence of human NOR-1 promoter (from -84 to -41; Nor/3CRE) containing the three putative CRE motifs or a consensus NBRE sequence¹¹ were used in EMSA as described.¹⁰ Supershift experiments were performed using antibodies against CREB, c-Fos, and c-Jun (Santa Cruz Biotechnology Inc.).

Western Blot Analysis

The levels of CREB (phosphorylated and unphosphorylated forms) in cell extracts from human VSMCs were analyzed by Western blot¹⁰ using specific antibodies (Santa Cruz Biotechnology Inc.).

Construction of NOR-1 Promoter Plasmids

The plasmid pNOR α -1703 containing the human NOR-1 promoter (from -1703 to +264) was kindly provided by Dr N. Ohkura (Growth Factor Division, National Cancer Research Institute, Tokyo,

Japan). Site-directed mutations of the three putative CRE sites present in NOR-1 promoter¹² were performed by the QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). The changes introduced in the sequence of the mutant construction [pNOR α -1703-(M)] were (-79)TGcatcAGCGTCCCATGcatgCACATTGcgtact(-46) (changes are indicated in lower case letters). The new sequence was analyzed by different promoter analysis software to confirm that no new response elements were generated.

Transient Transfection and Luciferase Assays

NIH-3T3 cells were transfected with luciferase expression vectors using Nucleofector (Amaya Biosystems) according to the manufacturer's protocol. Transfected cells were arrested for 36 hours and then were stimulated with human serum for 4 hours. Luciferase activity was measured in cell lysates using a luminometer. pSV β -gal (Promega) was used as an internal control.

Human Artery Sampling

Human aorta and coronary arteries from explanted hearts, from patients with dilated idiopathic cardiomyopathy (DIC) or CAD, were obtained. Coronary arteries were examined under low magnification and classified in two categories: areas with atherosclerotic lesions and nonatherosclerotic areas. The study and all human sampling followed the internal guidelines and was approved by the Ethics Committee of the Hospital of Santa Cruz i Sant Pau.

Angioplasty in the Porcine Model

The animal model selected for the angioplasty studies was the Yorkshire-Albino pig (body weight 30 to 35 kg; Piensos Victoria SA, Barcelona, Spain). The handling, maintenance and care of the animals, as well as all procedures performed in this study, were in accordance with institutional guidelines and followed the American Heart Association guidelines for animal research. The methodology for coronary balloon angioplasty has been previously reported.¹³ Coronary lesions were performed by three inflations of 8 atmospheres of a 4.0 \times 20.0 mm balloon catheter (Cordis). Time intervals of study from angioplasty to animal euthanasia were 1, 2, 4, and 6 hours (n=20). This angioplasty procedure resulted in overstretching of the artery, causing severe injury.

Analysis of Gene Expression in Human and Porcine Arteries

NOR-1 and Nur77 expression was assessed by RT-PCR. The specific oligonucleotides selected were as follows: NOR-1, 5'-AGGGCTGCAAGGGCTTTTCAAGAGA-3' and 5'-TGCTTTCTACAGGAGCTGCT-3'; Nur77, 5'-CCACAGCCTCCAGCCTTTT-3' and 5'-TTTCGCCGCCCTC-TTGTCAC-3'. Levels of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) were used to normalize results.¹⁰ Amplification was carried out by 24 (NOR-1 and Nur77) and 22 (GAPDH) cycles: denaturation, 94°C for 30 seconds; annealing, 61°C (NOR-1 and GAPDH) or 55°C (Nur77) for 1 minute; and polymerization, 72°C for 90 seconds. Digoxigenin-labeled PCR products were resolved by electrophoresis in agarose gels, transferred onto nylon membranes (Schleicher & Schuell) and detected as described.¹⁰

In Situ RT-PCR

In situ RT-PCR was performed in PTCA specimens using the EZ rTth RNA PCR Kit (Perkin Elmer) according to the manufacturer's protocol. The primers used for NOR-1 mRNA detection were as follows: 5'-GATGCTATCCAGCAGGAAA-3' and 5'-CATCAAGAACGGCCAAAAT-3'. Amplification was carried out by 25 cycles; the specific annealing conditions were 55°C for 90 seconds. Digoxigenin-labeled PCR products were detected using a system coupled to alkaline phosphatase and NBT/BCP.

Determination of DNA Synthesis and Cell Cycle Phase Distribution

Arrested human coronary SMCs were induced with 10% human serum, in medium containing 0.5 μ Ci/mL of [³H]thymidine in the presence or absence of increasing concentrations of phosphorothioate oligode-

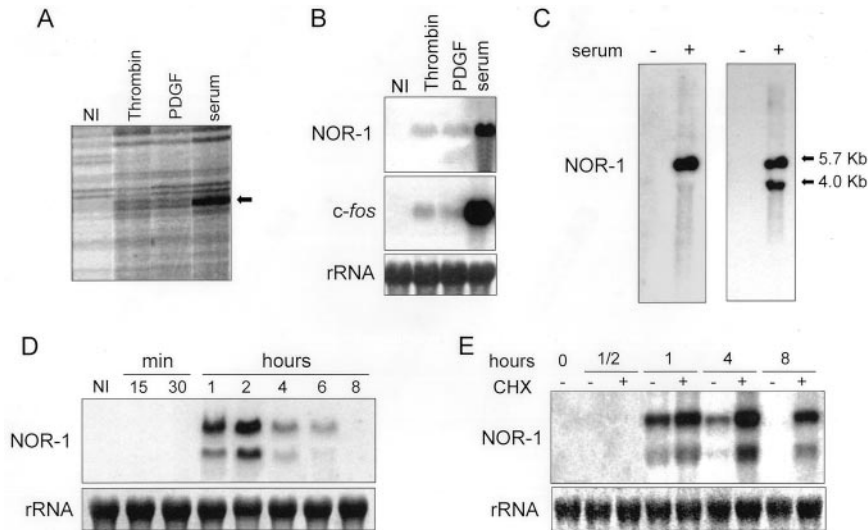


Figure 1. Identification of NOR-1 by mRNA-DD. A, Representative mRNA-DD analysis showing the induction by 10% human serum, 10 U/mL thrombin, and 5 nmol/L PDGF (after 1 hour of stimulation) of band 2. B, Arrested versus stimulated porcine coronary SMC Northern blots using the differentially displayed cDNA (band 2) or *c-fos* as probes. rRNA indicates ribosomal RNA. C, Arrested versus stimulated (serum for 1 hour) porcine coronary SMC blots using the cDNA corresponding to band 2 (left) or pNOR-1 α cDNA (right) as probes. D, Kinetics of NOR-1 induction by serum in human coronary SMCs. E, NOR-1 mRNA levels in human coronary SMC stimulated with serum in the presence or absence of cycloheximide (CHX) for different time periods.

oxynucleotides (ODNs) and [³H]thymidine incorporation was determined as described.⁹ The effect of ODNs on cell cycle was analyzed by flow cytometry as described.¹⁴ The antisense ODNs used were antisense-1 NOR-1 (AS₁-NOR; 5'-TTGGACGCAGGGCAT-3') and antisense-2 NOR-1 (AS₂-NOR; 5'-GCTGCCAAGGTCCAT-3') complementary to nucleotides 732 to 746 and 849 to 863 of human NOR-1 mRNA (Accession No. NM-006981), respectively. As controls, the corresponding sense sequences and an antisense ODN against *c-fos*, previously used to assess the involvement of this protooncogene in cell proliferation,¹⁵ were used.

In Vitro SMC Injury

The ability of antisense NOR-1 ODNs to inhibit SMC wound repair after mechanical injury was assessed in human coronary SMCs in culture as described.¹⁶ Briefly, confluent growth-arrested human coronary SMCs were scraped and then incubated for 72 hours at 37°C in the presence or absence of the ODNs indicated above. The cells were fixed and stained with methylene blue. Images were digitalized by a Sony 3CCD camera, and cell number in the denuded zone was determined.

Statistics

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

Results

DD/RT-PCR Analysis on Mitogen-Stimulated VSMCs

To identify new genes involved in VSMC activation, we stimulated porcine coronary SMCs with serum, PDGF, or thrombin and analyzed differential gene expression by mRNA-DD analysis. We isolated a total of 23 bands differentially regulated at least by one of the inducers used. Sequence analysis revealed that only two bands presented significantly identity with genes previously described. Band 23, induced by serum and PDGF, corresponded to thrombospondin-1. Band 2 (1010 bp) (Figure 1A) recognized a transcript of 5.7 kb early induced by serum, PDGF, and thrombin (Figures 1B and 1C, left panel). The nucleotide sequence of band 2 shared high homology with the 3'-untranslated region of members of the NGFI-B family of

orphan nuclear receptors: NOR-1,^{17,18} Nur77,^{19,20} and Nurrl.²¹

Isolation of Full-Length cDNA Clones

The open reading frame (ORF) of the clone λ SsNor32 (submitted to GenBank/EMBL Accession No. AJ011767) encodes for a polypeptide of 643 amino acid residues, that among the receptors mentioned above, exhibited the highest homology with NOR-1 α sequences. The long 3'-untranslated sequence (3072 bp) of this pNOR-1 α cDNA contained 9 copies of the sequence ATTTA, typical of short-lived mRNAs. Clone λ SsNor83 (submitted to GenBank/EMBL Accession No. AJ011768) exhibits an ORF coding for a polypeptide of 446 amino acid residues (pNOR-1 β) that does not contain the C-terminal region corresponding to the ligand-binding domain. Alignments of the porcine NOR-1 α and NOR-1 β amino acid sequence with their homologues in human, rat, and mouse revealed an extensive identity, ranged from 89% to 94% for NOR-1 α and 87% for NOR-1 β . The highest identity (100%) was found in the DNA binding domain. The leucine-zipper of the C-terminal region was conserved among the NGFI-B family members.

In Northern blot experiments, the pNOR-1 α cDNA recognized two transcripts (5.7 kb and 4.0 kb) transiently induced by serum in both porcine (Figure 1C, right panel) and human coronary SMCs (Figure 1D). The induction of NOR-1 mRNAs did not require de novo protein synthesis and was overinduced by cycloheximide (Figure 1E), as previously described in nonvascular cells.

Effect of Growth Factors and Cytokines on NOR-1 Expression

Serum, PDGF, and thrombin were the strongest inducers of NOR-1 (Figure 2). EGF and IGF (only detectable in overexposed films) also induced NOR-1. PDGF and thrombin synergize with IGF-1 to induce NOR-1, although, in a lesser extent than *c-fos*. The effect of other mitogens and cytokines, including lipopolysaccharide and angiotensin II (data not shown), on NOR-1 expression was negligible.

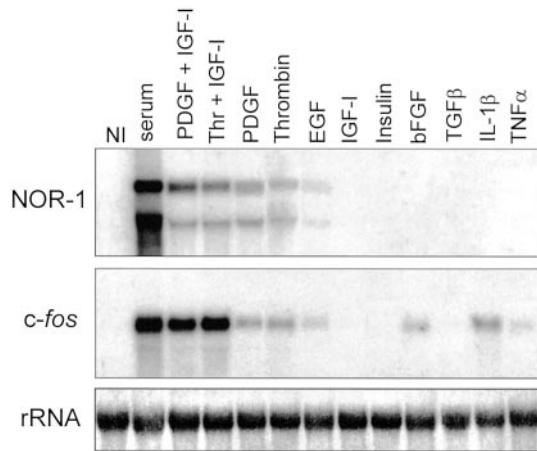


Figure 2. NOR-1 expression in human VSMCs. NOR-1 mRNA levels in human coronary SMCs stimulated with growth factors and cytokines for 1 hour. Representative blot is shown ($n=3$). rRNA indicates ribosomal RNA; bFGF, basic fibroblast growth factor; TGF β , transforming growth factor β ; IL-1 β , interleukin-1 β ; and TNF- α , tumor necrosis factor- α .

Signaling Pathways Involved in NOR-1 Induction

The induction of NOR-1 is dependent on protein kinase C (PKC) activation: it was induced by PMA (a PKC activator), whereas GF-109203X (a PKC inhibitor) inhibited NOR-1 expression induced by serum (Figure 3A). NOR-1 upregulation is also dependent on Ca²⁺ mobilization: A23187 (a calcium ionophore) induced NOR-1, whereas the calcium chelator EGTA inhibited its expression. Specific inhibitors of both G-protein receptors (pertussis toxin) and the mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase (PD98059) inhibited the induction of NOR-1 produced by serum (Figure 3A). Pertussis toxin completely abolished the induction of NOR-1 produced by thrombin (data not shown).

By EMSA, we observed an increase in the binding of nuclear extracts from serum-treated VSMCs to a probe containing a consensus NBRE (a NOR-1 response element)

that was prevented when PKC activation (by GF109203X) or Ca²⁺ mobilization (by BAPTA) was inhibited (Figure 3B).

Involvement of CREB in NOR-1 Induction

In serum induced VSMCs, CREB was activated by phosphorylation in Ser¹³³ (Figure 4A) and nuclear extracts from human VSMCs bind to a probe (Nor/3CRE) containing the three putative CRE sites present in NOR-1 promoter (from -84 to -41)¹² (Figure 4B). The effect was specific (competed by an excess of cold-probe) and was supershifted by an antibody against CREB but not by anti-c-Fos or anti-c-Jun antibodies.

The involvement of CRE sites in the upregulation of NOR-1 by serum was analyzed in NIH-3T3 cells. As in human VSMCs, in NIH3T3, serum-induced NOR-1 expression was prevented when PKC activation or Ca²⁺ mobilization was inhibited (Figure 4C). In transfection assays, the activity of NOR-1 promoter was prevented by either BAPTA (a calcium chelator) or GF-109203X and was completely abolished when the three CRE sites were mutated (Figure 4D).

Expression of NOR-1 in Adult Tissues

Heart and skeletal muscle express high levels of NOR-1, whereas low levels are detected in thoracic aorta, lung, and adrenal glands, and marginal expression (only detected in overexposed films) in the rest of porcine tissues analyzed (Figure 5). The expression pattern of Nur77, the main member of NGFI-B family, was similar to that of NOR-1. However, Nur77 exhibited lower expression than NOR-1 in myocardium (relative to that found in skeletal muscle) but higher in diaphragm, thoracic aorta, lung, and in adrenal glands.

Expression of NOR-1 in Human Arteries

NOR-1 mRNA levels in human nonatherosclerotic vessels (both in coronary arteries and aorta) from either DIC or CAD patients were low or undetectable (Figure 6A). NOR-1 was overexpressed in primary atherosclerotic lesions from CAD

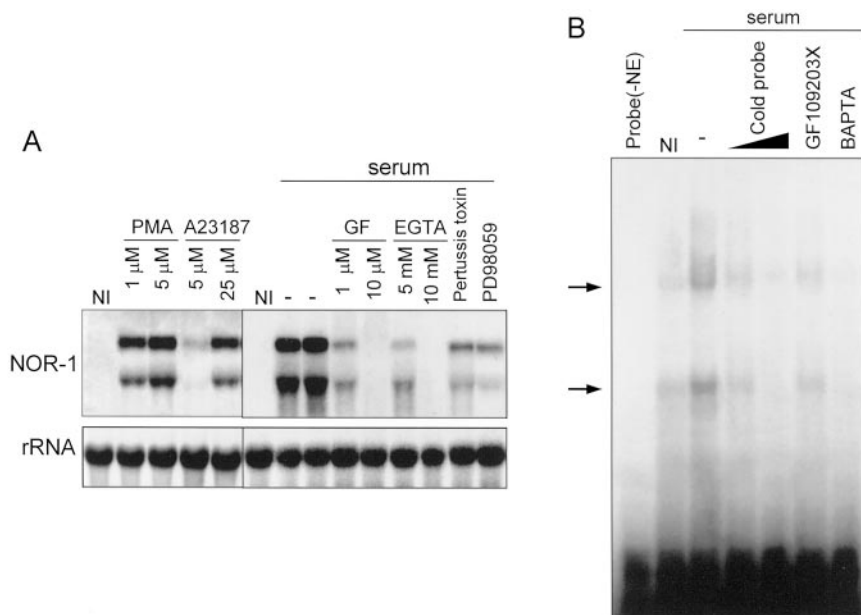


Figure 3. Signaling pathways involved in NOR-1 induction. A, Blot showing NOR-1 expression in human coronary SMCs stimulated with PMA or the calcium ionophore A23187 for 1 hour, and the effect of inhibitors of different signaling pathways. A representative blot is shown ($n=3$). GF indicates GF-109203X. B, EMSA showing the increase in the binding of nuclear extracts from serum-treated cells to a probe containing a consensus NBRE and the effect of GF-109203X and BAPTA (a Ca²⁺ chelator). Competition of the binding by 5- and 50-fold of free probe is shown. Arrows indicate retardation bands. Probe(-NE) indicates NBRE probe without nuclear extracts.

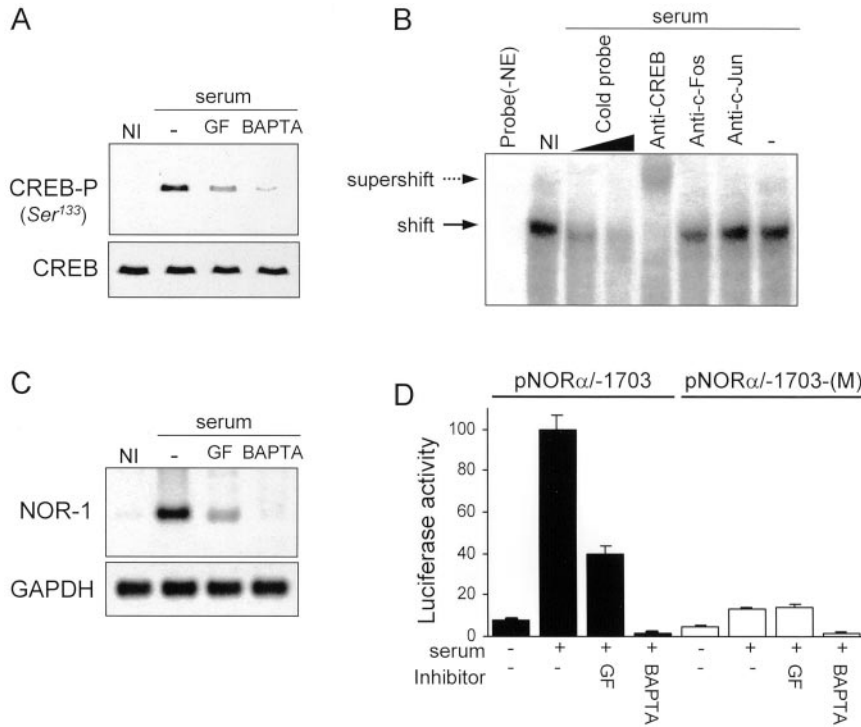


Figure 4. Mechanisms involved in NOR-1 upregulation. A, Western blot showing the effect of serum (after 10 minutes) on CREB phosphorylation in serine¹³³ (CREB-P) and the inhibitory effect of GF-109203X and BAPTA. Bottom, Total CREB levels. B, EMSA showing the ability of nuclear extracts from human VSMCs to bind to the probe Nor/3CRE. Effect of increasing amounts of free probe (5- and 50-fold) is shown. The supershift effect of anti-CREB antibodies but not anti-c-Fos or anti-c-Jun is shown. Probe(-NE) indicates probe Nor/3CRE without nuclear extracts. C, Effect of 10% serum, GF-109203X, and BAPTA on NOR-1 mRNA levels in NIH3T3 cells. D, Serum Increased NOR-1 promoter activity in cells transfected with the wild-type promoter (pNOR α -1703) but not with the mutant without the three putative CRE sites [pNOR α -1703-(M)]. Effect of the inhibition of either PKC or Ca²⁺ mobilization is shown. Luciferase activity were normalized by β -galactosidase activity and was calculated as percentage of that of pNOR α -1703 in serum-treated cells.

patients. Nur77 expression, which was detected in aorta but not in coronary arteries from DIC patients, was upregulated in primary coronary atherosclerotic lesions from CAD patients but to a lesser extent than NOR.

Expression of NOR-1 in Porcine Balloon Dilated Arteries

Percutaneous transluminal coronary angioplasty (PTCA) transiently upregulates NOR-1 mRNA in porcine coronary arteries with a pattern similar to that observed in VSMCs in culture (Figure 6B). No expression of Nur77 could be

detected. By in situ RT-PCR, significant expression of NOR-1 was detected in medial SMCs of the dilated arteries (Figure 6C).

Antisense NOR-1 ODNs Inhibit DNA Synthesis and Cell Cycle Progression

Antisense sequences (AS-NOR) were directed against the two putative ATG initiation codons of the human NOR-1.^{17,18} Both antisense NOR-1 ODNs efficiently inhibited [³H]thymidine uptake by human coronary SMC in a dose-dependent manner. Figure 7A shows the effect for AS₁-NOR. No effect was produced by sense NOR-1 ODNs. A similar inhibitory effect was produced by increasing concentrations of an antisense ODNs against *c-fos* (data not shown), previously used to assess the involvement of this protooncogene in cell proliferation.¹⁵ NOR-1 mRNA levels in AS-NOR ODN-treated cells were significantly lower than in control cells or cells treated with either sense NOR sequences or anti-*c-fos* ODNs (Figure 7B).

Flow cytometry analysis of cell cycle phase distribution revealed a significant reduction in cell entry in S phase after serum stimulation (40% and 42% by AS₁- and AS₂-NOR, respectively) and a concomitant increase in cells in G1 phase. Figure 7C shows representative FACS profiles corresponding to human VSMCs with and without AS₁-NOR. Sense NOR-1 ODNs did not produce any effect on cell cycle distribution. A similar effect was produced by antisense *c-fos* ODNs (41% reduction in cell entry in S and similar increase in cells in G1 phase).

Antisense NOR ODNs Inhibit Human SMC Growth After Injury

In a well-established in vitro model of wounding¹⁶ AS₁- or AS₂-NOR significantly inhibited VSMC regrowth into the

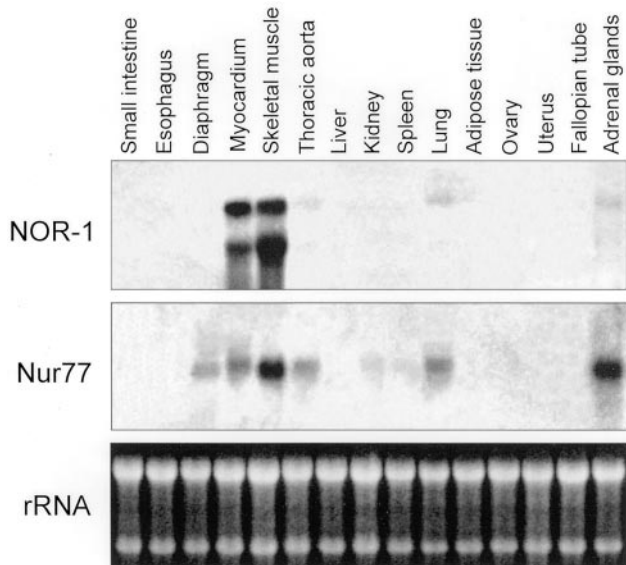


Figure 5. NOR-1 expression in porcine tissues. Blots showing mRNA levels of NOR-1 and Nur77 in porcine tissues. Representative blot is shown (n=3). rRNA indicates ribosomal RNA.

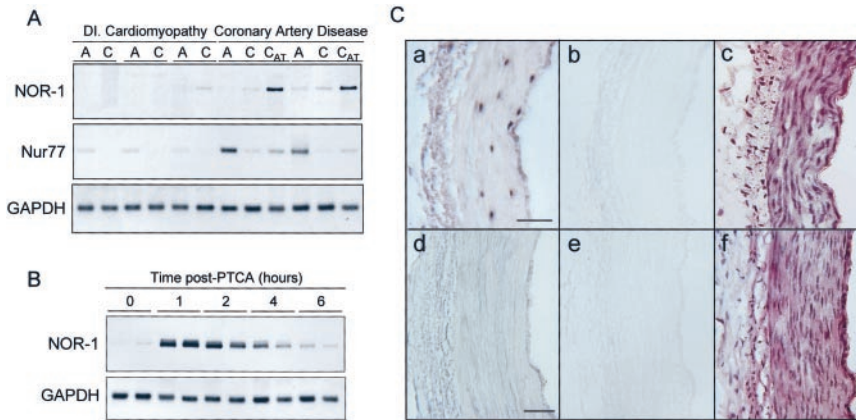


Figure 6. A, NOR-1 overexpression in atherosclerotic vessels. Expression of NOR-1 and Nur77 in human arteries from patients with dilated idiopathic (DI) cardiomyopathy and coronary artery disease. A indicates intima/media from aorta; C, intima/media from nonatherosclerotic coronary arteries; C_{AT}, intima/media from atherosclerotic coronary arteries. B, NOR-1 upregulation by balloon angioplasty. Expression of NOR-1 in porcine balloon dilated arteries. Representative experiment showing two dilated coronaries per time point. PTCA indicates percutaneous transluminal coronary angioplasty. C, In situ RT-PCR showing the induction of NOR-1 in medial VSMCs after PTCA. Serial sections from injured (a to c) and uninjured arteries (d to f). b and e correspond to negative RT-PCR controls; c and f correspond to hematoxylin and eosin stains. Bar = 50 μm.

denuded zone by 45% and 46% respectively (Figure 7D). In contrast, equivalent concentration of sense NOR-1 ODNs failed to modulate this process. The effect produced by antisense ODNs against NOR-1 was similar to that produced by the ODNs against *c-fos*. Figure 7E shows a representative picture from human VSMCs subjected to this procedure in the presence of AS₁-NOR-1.

Discussion

In this study, we used mRNA-DD analysis in a search for genes induced by mitogens in VSMCs using the porcine model, a highly recognized model of human resemblance for studying advanced SMC differentiation and atherosclerosis.²² We have identified NOR-1 as an immediate-early gene in VSMCs. NOR-1 was transiently upregulated by angioplasty in porcine coronary arteries and was overexpressed in human atherosclerotic primary lesions. Antisense NOR-1 ODNs

inhibited VSMC proliferation and wound healing after mechanical injury.

Two NOR-1 isoforms were cloned from porcine VSMCs. NOR-1 is an immediate-early gene that was strongly induced in VSMCs by mitogenic stimuli signaling through pathways involving tyrosine kinase receptors (PDGF and EGF) and G protein-coupled receptors (thrombin). In contrast, other agents such as cytokines that induced NOR-1 in gingival fibroblasts,²³ or angiotensin II that induced NOR-1 in fasciculata cells,²⁴ did not induce NOR-1 in VSMCs. Intracellular calcium increase as well as PKC and MAPK activation pathways, commonly activated in cell migration and proliferation, are involved in NOR-1 induction in VSMCs. In this regard, mitogens that use more than one pathway (ie, serum) had the strongest effect on NOR-1 induction, and the association of PDGF or thrombin with IGF-I increased the effect produced by each molecule alone. Therefore, NOR-1 could play a key role integrating different signaling pathways in

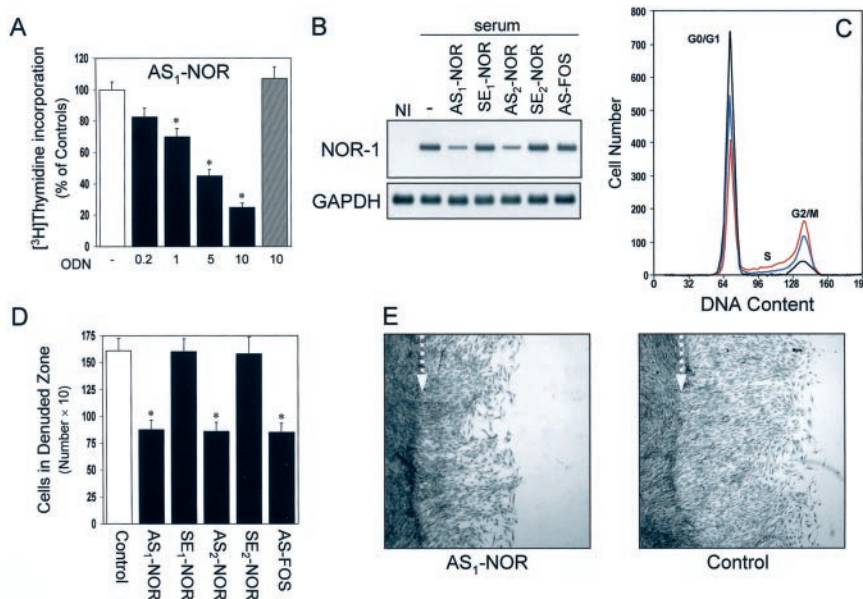


Figure 7. Antisense NOR-1 oligonucleotides inhibit DNA synthesis and wound repair in human coronary SMCs. A, Arrested VSMCs were stimulated with 10% human serum for 24 hours and [³H]thymidine incorporation was determined in the absence (white bars) or presence of increasing concentrations (μmol/L) of antisense NOR-1 ODNs (AS₁-NOR, black bars). Effect of the corresponding sense (SE₁-NOR, 10 μmol/L) is shown (shaded bars); (n=4 experiments performed in triplicate). B, Effect of oligonucleotides on NOR-1 mRNA levels analyzed by RT-PCR 3 hours after serum stimulation. AS-FOS indicates antisense *c-fos* ODNs. C, Representative flow cytometry analysis profiles from arrested (black line), serum-stimulated (red line), and AS₁-NOR-treated (blue line) human VSMCs. D, Antisense NOR-1 oligonucleotides inhibit wound repair after mechanical injury of human coronary SMCs. Confluent-arrested SMCs were scraped and then incubated for 72 hours in the absence (Control) or presence of 10 μmol/L oligonucleotides. Cell numbers in the denuded zone were counted and represented histodiagrammatically (n=3 experiments performed in triplicate). E, Representative data corresponding to AS₁-NOR-treated cells and Controls. Arrows indicate the wound edge; ODNs, oligonucleotides; AS-, antisense; SE- sense. *P<0.05 vs controls or cells treated with the corresponding sense oligonucleotides.

μmol/L oligonucleotides. Cell numbers in the denuded zone were counted and represented histodiagrammatically (n=3 experiments performed in triplicate). E, Representative data corresponding to AS₁-NOR-treated cells and Controls. Arrows indicate the wound edge; ODNs, oligonucleotides; AS-, antisense; SE- sense. *P<0.05 vs controls or cells treated with the corresponding sense oligonucleotides.

VSMCs, in processes such as thrombosis, which produces platelet activation/degranulation (releasing PDGF and EGF) and thrombin generation.

Transfection experiments indicate a key role for the CRE motifs present in NOR-1 promoter in NOR-1 upregulation produced by mitogenic stimuli. Indeed, CREB activation is a common output of both PKC- and calcium-dependent signaling pathways,²⁵ the main pathways involved in NOR-1 upregulation. Serum induced CREB phosphorylation, although no changes in CREB binding were observed, according with the ability of CREB to constitutively bind to its response element.²⁵

Although NOR-1 is transiently induced by mitogenic stimuli in cell culture, significant expression of NOR-1 was detected in several adult tissues, in particular in myocardium and skeletal muscle from both porcine and humans (data not shown), suggesting that in these muscle tissues NOR-1 could regulate genes involved in key housekeeping functions. The overlapping expression patterns of NGFI-B family genes in certain tissues and cells, the high homology among their amino acid sequences, and the ability of the three receptors to bind to a specific NGFI-B response element (NBRE)²⁶ could explain the functional redundancy observed in certain systems.²⁷ However, we observed dissimilar expression patterns in adult tissues and in the vascular wall under pathological conditions. Indeed, although in human primary atherosclerotic lesions NOR-1 and Nur77 were overexpressed, revascularization procedures that injure the vessel wall and induce VSMC proliferation transiently upregulated NOR-1 but not Nur77.

NGFI-B family genes have been involved in different cell functions, among them cell proliferation, cell differentiation, and cell apoptosis.⁸ It should be stressed that similar nonspecific roles have been reported for other early genes such as *c-fos* or *c-myc*.^{28,29} In this regard, it is likely that the particular outcome of NOR-1 activation will depend on the concomitant alterations in the expression of other genes taken place in a particular physiological context. In fact, the relationship between eukaryotic transcription factors, in particular the paradigmatic heterodimerization between nuclear receptors,³⁰ increase the complexity of molecular networks that operate in vascular cells. Nur77 but not NOR-1 can form heterodimers with RXR,³¹ enabling it to activate transcription of vascular genes in a ligand-dependent manner via the retinoic acid response elements. Because RXR has been directly involved in VSMC phenotypic modulation and in atherogenesis,^{5,32} and it is a common partner for other nuclear receptors that work in vascular cells such as PPARs or RAR,^{1,5,33} a potential competition of these alternative RXR heterodimeric partners for RXR should not be excluded. This interference/synergy relationship among nuclear receptors themselves or among other transcription factors could be important in the regulation of vascular cell function.³³

The expression pattern of NOR-1 is consistent with a role for this transcription factor in the molecular mechanisms underlying accelerated and spontaneous atherosclerosis. The nature of stimuli leading to NOR-1 upregulation, both in vitro and in vivo, and the intracellular signaling involved in such induction strongly suggest a role for NOR-1 in VSMC

proliferation. To further support this hypothesis, we analyze the effect of two sets of antisense ODNs directed against NOR-1. Antisense NOR-1 ODNs significantly inhibited human coronary SMC proliferation (reduced de novo DNA synthesis, cell cycle progression, and VSMC wound repair). The effectiveness of antisense NOR-1 ODNs blocking these processes was similar to that produced by antisense ODNs against the well characterized protooncogene *c-fos*, which like NOR-1 is transiently upregulated in VSMCs and in the porcine coronary arteries after PTCA.^{9,28,34} We selected *c-fos* as a comparative partner because a proportional relationship between the degree of *c-fos* expression and VSMC proliferation has been established both in vivo³⁵ and in vitro,⁹ and antisense ODNs against *c-fos* have been successfully used to inhibit cell proliferation in different systems including VSMCs.^{15,36} Our results strongly suggest a role for NOR-1 in VSMC growth, in agreement with different lines of evidence from other authors supporting a role for this orphan nuclear receptor in cell proliferation in different systems. Indeed, NOR-1 is essential for proliferation of the semicircular canals of the inner ear as has been recently demonstrated in NOR-1 knockout mice.³⁷ In addition, among the NGFI-B genes only the oncogenic conversion of NOR-1 has been described.³⁸

In summary, the list of nuclear receptors potentially involved in atherosclerosis and in CAD is growing, as a result of their major function regulating lipid metabolism³⁹ or as players directly involved in vascular biology. In contrast to other nuclear receptors, NOR-1 expression is rapidly and highly modulated in VSMCs in response to mitogenic stimuli. In fact, recently a wide screening of genes induced by serum revealed that NOR-1 is a major serum-responsive gene in human fibroblasts.⁴⁰ Although the identification of the genes downstream regulated by NOR-1 will be necessary to better understand the mechanism underlying its involvement in atherogenic processes, our results reveal NOR-1 as a potential regulatory factor in vascular cell function and a new target in future strategies for vascular drug discovery.

Acknowledgments

This work has been possible thanks to a grant funded by Maraton-TV3 for Heart Diseases and the Fundació de Investigació Cardiovascular and by FIS-99/0907 and FIS-PI020361. The authors thank the Heart Transplant Team of the Division of Cardiology and Cardiac Surgery of the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, for their collaboration. Jordi Rius is a recipient of a Research Fellowship from DURSI.

References

1. Marx N, Schonbeck V, Lazar MA, Libby P, Plutzky J. Peroxisome proliferator-activated receptor γ activators inhibit gene expression and migration in human vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 1998;83:1097–1103.
2. Staels B, Koenig W, Habib A, Merval R, Lebret M, Torra IP, Delerive P, Faadel A, Chinetti G, Fruchart JC, Najib J, Maclouf J, Tedgui A. Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPAR α but not by PPAR γ activator. *Nature*. 1998;393:790–793.
3. Miano JM, Topouzis S, Majesky MW, Olson EN. Retinoid expression and all-trans retinoic acid-mediated growth inhibition in vascular smooth muscle cells. *Circulation*. 1996;93:1886–1895.
4. Neuville P, Yan Z, Gidlof A, Pepper MS, Hansson GK, Gabbiani G, Sirsjo A. Retinoic acid regulates arterial smooth muscle cell proliferation and phenotypic features in vivo and in vitro through an RAR α -dependent signaling pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:1430–1436.

5. Haxsen V, Adam-Stitah S, Ritz E, Wagner J. Retinoids inhibit the actions of angiotensin II on vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 2001;88:637–644.
6. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell.* 1995;83:835–839.
7. Giguère V. Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocr Rev.* 1999;20:689–725.
8. Maruyama K, Tsukada T, Ohkura N, Bandoh S, Hosono T, Yamaguchi K. The NGFI-B subfamily of the nuclear receptor superfamily. *Int J Oncol.* 1998;12:1237–1243.
9. Martínez-González J, Viñals M, Vidal F, Llorente-Cortés V, Badimon L. Mevalonate deprivation impairs IGF-I/insulin signaling in human vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis.* 1997;135:213–223.
10. Rodríguez C, Martínez-González J, Sánchez-Gómez S, Badimon L. LDL downregulate CYP51 in vascular endothelial cells and in the arterial wall through a SREBP-2-dependent mechanism. *Circ Res.* 2001;88:268–274.
11. Philips A, Lesage S, Gingras R, Maira M, H, Gauthier Y, Hugo P, Drouin J. Novel dimeric Nur77 signalling mechanism in endocrine and lymphoid cells. *Mol cell Biol.* 1997;17:5946–5951.
12. 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.
13. Meyer BJ, Fernández-Ortiz A, Mailhac A, Falk E, Badimon L, Don Michael A, Chesebro JH, Fuster V, Badimon JJ. Local delivery of r-hirudin by a double-balloon perfusion catheter prevents mural thrombosis and minimizes platelet deposition after angioplasty. *Circulation.* 1994;90:2474–2480.
14. Darzinkiewicz Z, Juan G. Nucleic acid analysis. In: Robinson JP, ed. *Current Protocols in Cytometry.* New York, NY: John Wiley and Sons, Inc; 1997:1–24.
15. Leon Y, Vazquez 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.
16. Lowe HC, Fahmy RG, Kavurma MM, Baker A, Chesterman CN, Khachigian LM. Catalytic oligodeoxynucleotides define a key regulatory role for early growth response factor-1 in the porcine model of coronary in-stent restenosis. *Cir Res.* 2001;89:670–677.
17. 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.
18. Hedvat CV, Irving SG. The isolation and characterization of MINOR, a novel mitogen-inducible nuclear orphan receptor. *Mol Endocrinol.* 1995;9:1692–1700.
19. Hazel TG, Nathans D, Lau LF. A gene inducible by serum growth factors encodes a member of the steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85:8444–8448.
20. Milbrandt J. Nerve growth factor induces a gene homologous to the glucocorticoid receptor gene. *Neuron.* 1988;1:183–188.
21. Law SW, Conneely OM, DeMayo FJ, O'Malley BW. Identification of a new brain-specific transcription factor, Nurr1. *Mol Endocrinol.* 1992;6:2129–2135.
22. Badimon L. Atherosclerosis and thrombosis: lessons from animal models. *Thromb Haemost.* 2001;86:356–365.
23. Borghaei RC, Sinai ES, 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.
24. Fernández PM, Brunel F, Jimenez MA, Saez JM, Cereghini S, Zakin MM. Nuclear receptors Nor1 and NGFI-B/Nur77 play similar, albeit distinct, roles in hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Endocrinology.* 2000;141:2392–2400.
25. Mayr B, Montminy M. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Bio.* 2001;2:599–609.
26. Wilson TE, Fahrner TJ, Johnston M, Milbrandt J. Identification of the cDNA binding site for NGFI-B by genetic selection in yeast. *Science.* 1991;256:1296–1299.
27. Cheng LEC, Chan FKM, 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.
28. Rothman A, Wolner B, Button D, Taylor P. Immediate-early gene expression in response to hypertrophic and proliferative stimuli in pulmonary arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 1994;269:639–6404.
29. Macdonald K, Bennet MR. Cdc25A is necessary but not sufficient for optimal c-myc induced apoptosis and cell proliferation of vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 1999;84:820–830.
30. 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.
31. Mangelsdorf DJ, Evans RM. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell.* 1995;83:841–850.
32. Claudel T, Leibowitz MD, Fievet C, Tailleux A, Wagner B, Repa JJ, Torpier G, Lobaccaro JM, Paterniti JR, Mangelsdorf DJ, Heyman RA, Auwerx J. Reduction of atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice by activation on the retinoid X receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;27:2610–2615.
33. Benson S, Padmanabhan S, Kurtz TW, Pershadsingh HA. Ligands for the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and the retinoid X receptor-alpha exert synergistic antiproliferative effects on human coronary artery smooth muscle cells. *Mol Cell Biol Res Commun.* 2000;3:159–164.
34. Badimon L, Alfon J, Royo T, Berrozpe M, Martínez-González J, Vidal F, Chesebro JH, Fuster V, Badimon JJ. Cell biology of restenosis post-angioplasty. *Z Kardiol.* 1995;84:145–149.
35. 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.
36. Suggs W, Olson SC, Mandani D, Patel S, Eith FJ. Antisense oligonucleotides to c-fos and c-jun inhibit intimal thickening in a rat vein graft model. *Surgery.* 1999;126:443–449.
37. 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.
38. Labelle Y, Zucman J, Stenman G, Kindblom LG, Knight J, Turc-Carel C, Dockhorn-Dworniczak B, Mandahl N, Desmaze C, Peter M, Aurias A, Delattre O, Thomas G. Oncogenic conversion of a novel orphan nuclear receptor by chromosome translocation. *Hum Mol Genet.* 1995;4:2219–2226.
39. Tall AR, Costet P, Luo Y. “Orphans” meet cholesterol. *Nat Med.* 2000;6:1104–1105.
40. Iyer VR, Eisen MB, Ross DT, Schuler G, Moore T, Lee JCF, Trent JM, Staud LM, Hudson J, Boguski MS, Lashkari D, Shalon D, Botstein D, Brown PO. The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum. *Science.* 1999;283:83–87.

To: Lina Badimon <lbmucv@cid.csic.es> From: atvb@cmm.ki.se Subject: ATVB/2003/010371 -- Manuscript Decision Cc: jrius@hsp.santpau.es
Thank you for the great collaboration within year 2003.
A HAPPY ACTIVE JOYFUL YEAR 2004!

ATVB EUROPE: December 29, 2003

Prof. Lina Badimon
Cardiovascular Research Center
ICCC/CSIC-Hosp. Sta. Creu i S. Pau
C/ Jordi Girona 18-26
Barcelona 08034
Spain

MS no: ATVB/2003/010371
Title: Involvement of Neuron-derived Orphan Receptor-1 (NOR-1) in LDL-induced Mitogenic Stimulus in Vascular Smooth Muscle Cells: Role of CREB

Dear Prof. Badimon:

We are pleased to inform you that your revised manuscript is now acceptable for publication in Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. We tentatively expect the paper to be published in the March 2004 issue. ATVBeFirst posting will occur in about 7-10 days, if all materials have been submitted as designated in the most recent instructions to authors. You may access ATVBeFirst by going to www.atvb.org and clicking on the ATVBeFirst button.

Charges for publication in Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology are \$60 per printed page. We will proceed directly with processing for publication, and the publisher, Lippincott Williams & Wilkins, will bill you later. During the copyediting phase, there may be some changes in phraseology, but there will be no alteration of scientific content. When you receive your galley proofs, please read, correct, and return them immediately so that publication will not be delayed.

Thank you for sending this interesting work to Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.

With best wishes,

Johan Thyberg, MD, PhD
Prof. of Cell & Molecular Biology
Associate Editor ATVB Europe
atvb@cmm.ki.se

Goran K. Hansson, MD, PhD
Prof. of Cardiovascular Research
European Editor ATVB Europe
atvb@cmm.ki.se

**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

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

Short title: LDL induce NOR-1 in VSMC

Total word count: 4802

Abstract: 183

Figures #: 5 + 2 on line

Address for correspondence: Prof. Lina Badimon
Laboratorio de Investigación Cardiovascular
Hospital de la Santa Creu i Sant Pau
Sant Antoni Maria Claret # 167
08025 Barcelona (Spain)
Phone/Fax:34-93 2919285
e-mail: lbmucv@cid.csic.es

Abstract

Objective—Low density lipoproteins (LDL) 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 VSMC as efficiently as antisense against the protooncogene *c-fos*. The up-regulation of NOR-1 mRNA levels by LDL involves pertussis-sensitive G protein-coupled receptors, Ca^{2+} mobilization, protein kinase A (PKA) and 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), and in transfection assays a dominant-negative of CREB inhibits NOR-1 promoter activity while mutation of specific CRE sites in the NOR-1 promoter abolishes LDL-induced NOR-1 promoter activity. **Conclusions**—In VSMC LDL-induced mitogenesis involves NOR-1 up-regulation through a CREB dependent mechanism. CREB could play a role in the modulation by LDL of key genes (containing CRE sites) involved in atherogenesis.

Key words: atherosclerosis, lipoproteins, smooth muscle cells, gene expression, proliferation

Introduction

Vascular smooth muscle cell (VSMC) migration and proliferation play key roles in the pathophysiology of vascular remodeling associated to atherosclerotic diseases.^{1,2} Since low density lipoproteins (LDL) are key factors in the onset and development of atherosclerosis, their effects on VSMC have been investigated.²⁻⁵ Indeed, LDL 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 VSMC.¹⁶ NOR-1, together with Nur77 and Nurr1, form the 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 up-regulated by coronary angioplasty and both, NOR-1 and Nur77, are over-expressed 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 it is linked to LDL-induced VSMC mitogenic effects. NOR-1 induction by LDL involved pertussis sensitive G proteins-coupled receptors, Ca²⁺ mobilization, the activation of different protein kinases [protein kinase A (PKA) and C (PKC), 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 up-regulation 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 LDL and VLDL were isolated from pooled sera of healthy blood donors of the Barcelona area as previously described.²⁰ The content of protein (BCA protein assayTM, Pierce) and cholesterol (Cholesterol assay kitTM, RefLab) in the lipoproteins were 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 Inc.), and did not contain any detectable levels of thiobarbituric-acid-reactive substances (TBARS). Oxidized LDL (oxLDL) were 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 about 40 nmol malonaldehyde/mg LDL protein.

VSMC cultures

VSMC were obtained from human non-atherosclerotic arteries of hearts removed in transplant operations by a modification of the explant technique,²¹ and those used in the experiments were between the 3rd and 5th passage. Briefly, VSMC were cultured in M199 supplemented with 20% fetal calf serum (FCS), 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. Cells were seeded in multiwell-plate and at subconfluency were arrested 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, VSMC were preincubated with them for 30 minutes before stimulus (unless otherwise stated). The inhibitors used

were pertussis toxin (Sigma) (added 16 hours prior 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 analyzed measuring the mitochondrial dehydrogenase activity by a commercial kit (XTT based assay for cell viabilityTM, Roche).

In transfection experiments we used rat VSMC obtained by the explant technique.²¹ Rat VSMC 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 UltraspecTM (Biotex) according to the manufacturer's recommendations. RNA samples were fractionated in 1.2 % agarose gels containing formaldehyde, were transferred by capillary to nylon membranes (NytranTM plus, Schleicher & Shuell) and UV-cross-linked. Filters were prehybridized and hybridized as described previously.²⁰ NOR-1 cDNA labeled with [α -³²P]dATP (3000 Ci/mmol, Amersham) were used as a probe. Filters were exposed to Agfa Curix RP2 X-ray films at -80°C.

RT-PCR

Total RNA from VSMC 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'-AGGGCTGCAAGGGCTTTTTCAAGAGA-3' and 5'-TGCTTTCTACAGGAGCTGCT-3'; and for rat, 5'-AGGGCTGCAAGGGCTTCTTCAAGA GA-3' and 5'-TGCTTTCTATGGGAGCTGCT-3'. Amplification was carried out by 24 cycles: denaturation 94°C for 30 s; annealing, 61°C for 1 min and polymerization, 72°C for 1 min 30 s. 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 anti-digoxigenin 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 SMCs were stimulated with LDL (30 mg protein/dL) in medium containing 0.5 µCi/mL of [³H]thymidine in presence or absence of phosphorothioate oligodeoxynucleotides (ODN) 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'-TTGGACGCAGGGCAT-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 VSMC were cultured and stimulated with lipoproteins as indicated above. 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 orthovanadate]. Proteins were analyzed by Western blot as described previously.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 SupersignalTM detection system (Pierce). Equal loading of protein in each lane was verified staining filters with Ponceau.

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Nuclear extracts (3 μ g) from VSMC and a doubled 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 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 using QuikChange Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene) and the oligonucleotide 5'-GGGAGGAGGAGGGTGCatcAGCGTCCCATGGCGTCACATTGACG-3';¹⁶ mtCRE2 and mtCRE3 were kindly provided by Dr. H. Tokumitsu (Department of Chemistry,

Kagawa Medical University, Kagawa, Japan), that used the oligonucleotide 5'-AGCGTCCCATGGCcagtCATTGACGTCTCG-3' and 5'-CATGGCGTCACATactgGTCTCGCATTCCA-3' respectively, as described.²⁴

Transient transfection and luciferase assays

Rat VSMC were transfected with luciferase expression vectors (wild pNOR α /-1703 or with constructs mutated in single CRE boxes) using LipofectamineTM Reagent (Invitrogen) and PlusTM Reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. Transfected cells were arrested for 48 hours and then were 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 co-transfection 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 one-factor ANOVA, followed by Fisher PLSD to assess specific group differences.

Results

LDL induce NOR-1 expression in VSMC

To assess the effect of native LDL on NOR-1 expression in VSMC, arrested cells were stimulated with increasing concentrations 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 up-regulation 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 (30-60 mg/dL) was similar to that of serum. NOR-1 expression was transiently induced by LDL following the same pattern than in serum-induced cells,¹⁶ peaking at 1 hour and decreasing to undetectable levels 8 hours after stimulus (Figure 1B).

Antisense NOR-1 ODN inhibit LDL induced DNA synthesis

NOR-1 up-regulation by LDL was significantly reduced when human VSMC were treated with antisense ODN targeted against NOR-1 (AS-NOR-1) while the corresponding sense sequences (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 VSMC stimulated with LDL.

Signalling pathways involved in NOR-1 induction

LDL activate different signal transduction pathways in VSMC. 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 up-regulation 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 protein kinase C (PKC) activation (inhibited by GF-109203X).

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 protein kinase A (PKA) inhibitor] also inhibited the LDL effect.

LDL induce CREB phosphorylation

Since CREB activation is a common output of the signal transduction pathways involved in NOR-1 up-regulation²⁶ 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 (a calcium chelator) or GF-109203X (a PKC inhibitor), two compounds that reduced LDL-induced NOR-1 expression. Thus, CREB could play a major role in NOR-1 up-regulation by LDL.

CREB binds the CRE sites present in the NOR-1 promoter

In gel shift assays nuclear extracts from human VSMC bind to a probe (Nor/3CRE) containing the three putative CRE sites present in NOR-1 promoter (from –83 to –42)²³ (Figure I, please see www.ahajournals.org). Although LDL induced CREB phosphorylation, no changes in CREB binding were observed, according with the ability of CREB to constitutively bind to its response element.²⁶ The binding was specific (competed 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 VSMC. As in human VSMC, in these cells LDL induced NOR-1 expression and both a calcium chelator (BAPTA-AM) and a PKC inhibitor (GF-

109203X) prevented this effect (Figure II, please see www.ahajournals.org). In transfection assays, LDL induced NOR-1 promoter activity (\approx 4-fold over unstimulated 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 co-transfection with a dominant-negative of CREB (CREB^{133*}). Finally, by site-direct mutagenesis we showed that when 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 induce 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 up-regulate NOR-1, an orphan receptor involved in VSMC proliferation,¹⁶ through a complex mechanism involving multiple signalling 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 neuroendocrine 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 promote VSMC proliferation.²⁵ Here, we show that LDL induce NOR-1

expression in VSMC through a complex network of signal transduction pathways, including pertussis sensitive G proteins, Ca^{2+} 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 prevent NOR-1 up-regulation promoted by LDL, according with the major role of these pathways in native LDL-induced vascular cell proliferation.^{7,30} We previously showed that growth factors such as PDGF or EGF are poor inducers of NOR-1, while serum is a strong inducer of NOR-1 acting through a complex web of signalling pathways.¹⁶ By nature LDL are highly complex molecules different from growth factors such as PDGF, that promote early gene induction and cell growth acting through its canonical PDGF receptor. Indeed, LDL 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 LDL 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 up-regulation 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 VSMC 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 signalling 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 VSMC under apoptotic stimulus³² and its over-expression 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 VSMC.³⁵ Finally, although NOR-1, Nur77 and Nurr1 are closely related orphan receptors their induction patterns in VSMC are not coincident, in this regard conditioned medium from macrophages exposed to oxLDL strongly induce Nur77 in VSMC but had minor effect on NOR-1 expression.¹⁹

Since 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 LDL did not change basal CREB binding, according 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 up-regulation by LDL. Indeed, we show that co-transfection with a dominant negative of CREB (CREB with a single mutation in Ser¹³³) which binds to CRE sequences but can not 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, according with previous results in non vascular cells induced by the over-expression of a constitutive active form of calcium/calmoduline kinase kinase (CaM-KK).²⁴ Therefore, CREB activation seems to be key in LDL-induced NOR-1 up-regulation. The activation of CREB by LDL could be relevant beyond NOR-1 up-regulation 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 VLDL, lipoproteins that also activate CREB and promote vascular cell proliferation,^{8,9,41} also up-regulate 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 NF- κ B,⁴²⁻⁴⁴ only had a minor effect on NOR-1 up-regulation.

In summary, circulating LDL levels could modulate vascular function through complex gene programs involving downstream genes regulated by CREB among them NOR-1. Since NOR-1 expression is rapidly and highly induced in VSMC 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 has been possible thanks to 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. The authors thank 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. Authors are indebted to the technical assistance provided by Olga Bell and Silvia Aguiló. Jordi Rius has been a recipient of a Research Fellowship from Fundació de Investigació Cardiovascular-Catalana-Occidente and DURSI.

References

1. Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-126.
2. Lüscher AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000;407:233-241.
3. Steinberg D, Wizum JL. Lipoproteins and atherogenesis. *JAMA*. 1990;264:3047-3052.
4. Grundy SM. Role of low-density lipoproteins in atherogenesis and development of coronary heart disease. *Clin Chem*. 1995;41:139-146.
5. Navab M, Fogelman AM, Berliner JA, Territo MC, Demer LL, Frank JS, Watson AD, Edwards PA, Lüscher AJ. Pathogenesis of atherosclerosis. *Am J Cardiol*. 1995;76:18C-23C.
6. Libby P, Miao P, Ordovas JM, Schaefer EJ. Lipoproteins increases growth of mitogen-stimulated arterial smooth muscle cells. *J Cell Physiol*. 1985;124:1-8.
7. Weisser B, Locher R, de Graaf J, Vetter W. Low density lipoprotein subfractions and [Ca²⁺]_i in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 1993;73:118-124.
8. 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*. 1994;14:288-298.

9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. Sachinidis A, Ko Y, Wieczorek 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.

17. Giguère V. Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocr Rev.* 1999;20:689-725.
18. Maruyama K, Tsukada T, Okhura N, Bando S, Hosono T, Yamaguchi K. The NGFI-B subfamily of the nuclear receptor superfamily. *Int J Oncol.* 1998;12:1237-1243.
19. 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 atherogenesis: decreased lesion formation in carotid artery ligation model in TR3 transgenic mice. *Circulation.* 2002;106:1530-1535.
20. 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 Tromb Vasc Biol.* 2001;21:804-809.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. 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 Letters.* 2002;522:88-92.

25. 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.
26. Mayr B, Montminy M. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2:599-609.
27. 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.
28. 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.
29. Garrington TP, Johnson GL. Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signalling pathways. *Curr Opin Cell Biol*. 1999;11:211-218.
30. 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.
31. Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*. 1990;343:425-430.
32. 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.

- 33.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;23:2002-2007.
- 34.Perlmann T, Jansson L. A novel pathway for vitamin A signaling mediated by RXR heterodimerization with NGFI-B and Nurr1. *Genes Dev.* 1995;9:769-782.
- 35.Wakino S, Kintsher 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.
- 36.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.
- 37.Gonzalez GA, Montminy MR. Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell.* 1989;59:675-680.
- 38.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.
- 39.Bottazzi ME, Buzzai M, Zhu X, Desdouets C, Brechot C, Associan 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.
- 40.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.
41. 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.
42. 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 Heart Circ Physiol*. 2003;284:H644-H653.
43. 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.
44. 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 endothelia-denuded rabbits. *J Cell Biochem*. 2003;88:836-847.

Figure legends

Fig 1. LDL induced NOR-1 expression in human VSMC. 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, VSMC were stimulated with LDL (30 mg/dL) at different times. Control: non-induced cells.

Blots are representative of three independent experiments. rRNA indicates ribosomal RNA.

Fig 2. NOR-1 antisense inhibited LDL-induced VSMC DNA synthesis. A, arrested human VSMC were preincubated 6 hours with antisense oligodeoxynucleotides (10 $\mu\text{mol/L}$) 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 VSMC treated with AS-NOR-1 (10 $\mu\text{mol/L}$) 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. LDL-treated cells (black bars) and untreated cells (white bars). Results represent the mean \pm SEM (n= 3 independent experiments performed in triplicate). $p < 0.05$: *, vs. LDL untreated cells (Control or treated with SE-NOR-1); †, vs. LDL untreated cells; ‡, vs. cells treated with LDL alone or with LDL plus ODNs other than AS-NOR-1 or AS-FOS.

Fig 3. Signalling pathways involved in NOR-1 induction. VSMC were pretreated with different signal pathway inhibitors, stimulated with LDL (30 mg/dL) for 1 hour and NOR-1 mRNA levels were analyzed by RT-PCR. A, effect of pertussis toxin (PTX, 1 or 10 ng/mL); BAPTA-AM (10 or 50 $\mu\text{mol/L}$) or GF-109203X (GF, 5 or 15 $\mu\text{mol/L}$) on LDL-induced NOR-1 mRNA levels. B, effect of PD98059 (PD, 10 or 50 $\mu\text{mol/L}$), SB 203580 (SB, 2 or 10 $\mu\text{mol/L}$) or of H-89 (1 or 5 $\mu\text{mol/L}$) on LDL-induced NOR-1 mRNA levels. Control: non-induced cells. Representative blots (n=3) are shown.

Fig 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 $\mu\text{mol/L}$) or GF-109203X (GF, 15 $\mu\text{mol/L}$) on CREB activation produced by LDL treatment (for 10 minutes). Representative blots (n=3) are shown.

Fig 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), effect that was prevented by either BAPTA-AM or GF-109203X. NOR-1 promoter activity was also prevented by either co-transfection with a dominant negative of CREB (CREB^{133*}) or by mutation on CRE sites (mtCRE1, mtCRE2 or mtCRE3). LDL-treated cells (black bars) and untreated cells (white bars). Results represent the mean \pm SEM (n= 3 independent experiments performed in triplicate). $p < 0.05$: *, vs. LDL untreated cells; †, vs. cells transfected with only wild-type promoter and treated with LDL alone.

Figure 1

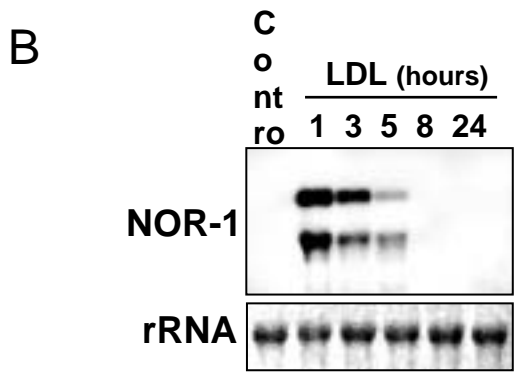
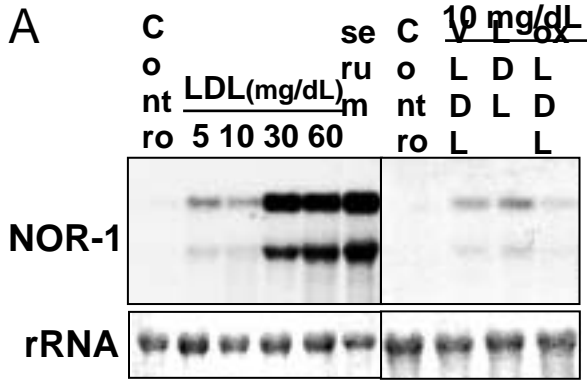


Figure 2

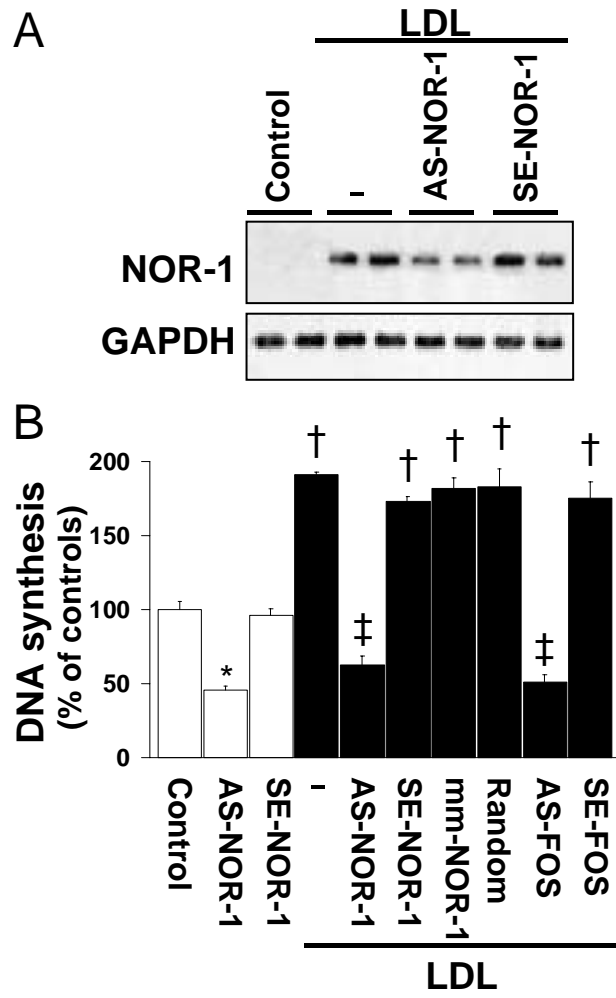


Figure 3

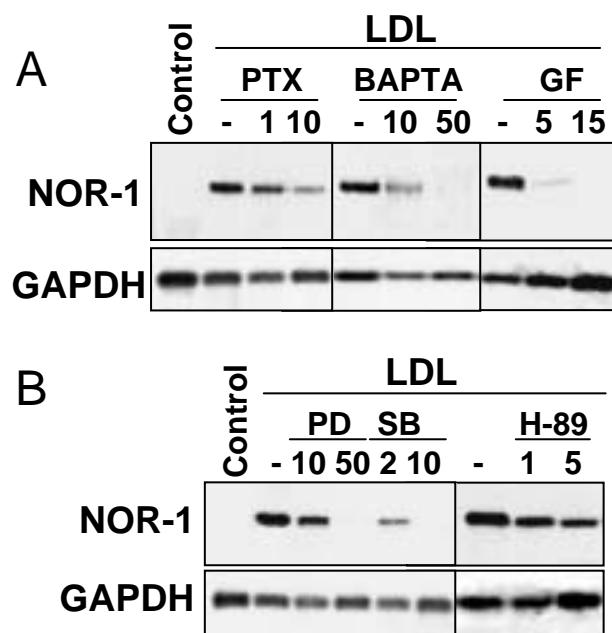


Figure 4

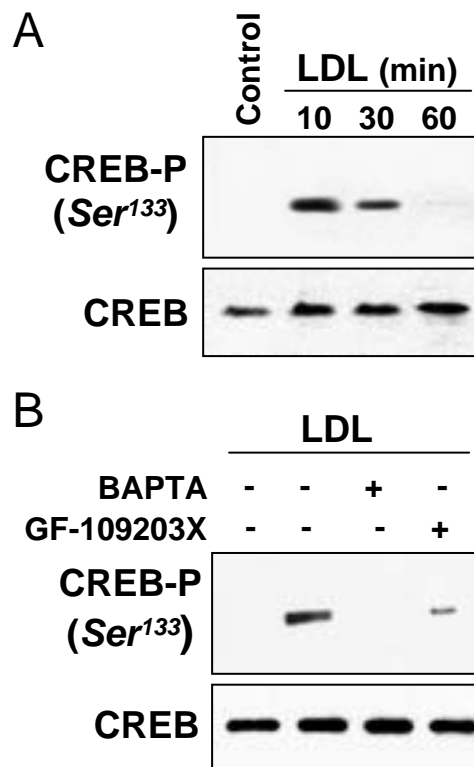
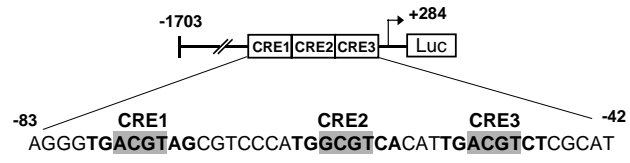


Figure 5

A



B

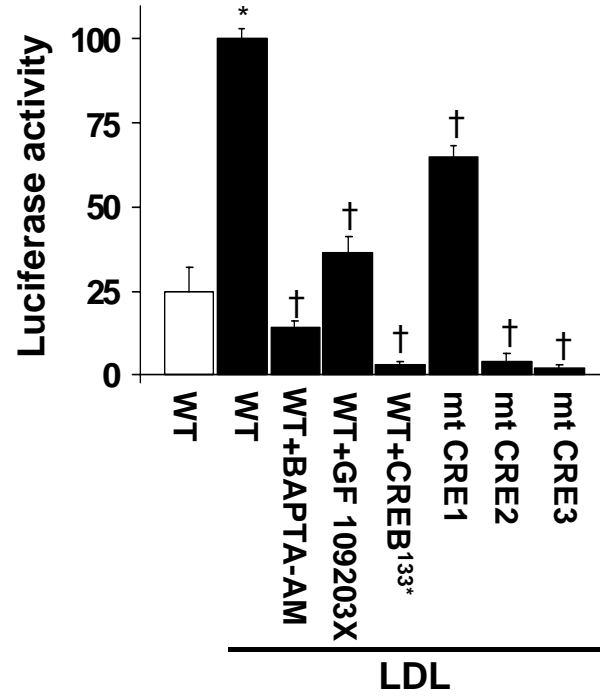


Figure 1

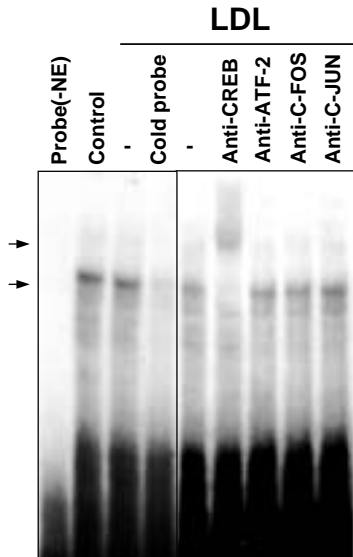


Fig 1. CREB binds CRE motifs present in NOR-1 promoter. EMSA showing the ability of nuclear extracts from human VSMC to bind to the probe Nor/3CRE. The effect of an excess of cold probe (50-fold) is shown. The supershift effect of anti-CREB antibodies but not anti-ATF-2, anti-c-Fos or anti-c-Jun is shown. Probe(-NE) indicates probe Nor/3CRE without nuclear extracts. Control: non-induced cells. A representative blot (n= 3) is shown. CREB indicates total CREB protein levels.

Figure II

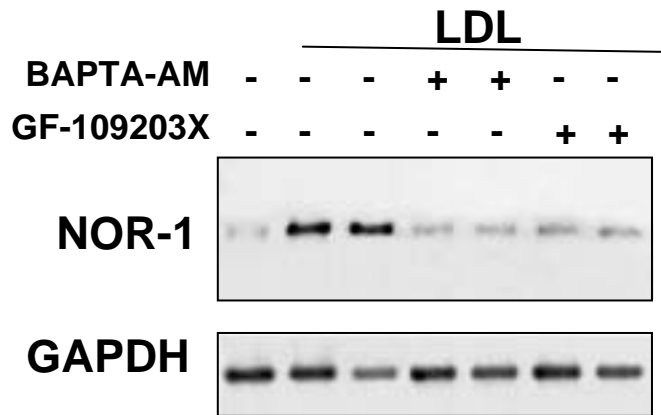


Fig II. LDL induce NOR-1 expression in rat VSMC. NOR-1 mRNA levels in rat VSMC stimulated with LDL (30 mg/dL) in the presence or absence of BAPTA-AM (50 μ mol/L) or GF-109203X (15 μ mol/L) (n=3).

NOR-1 S'EXPRESSA A LES CML

Les CML tenen una gran importància en el desenvolupament de l'aterosclerosi i poden ser una diana farmacològica en el tractament d'aquesta patologia (Dzau VJ. *et al.* 2002). A pesar de que s'han descobert nombrosos mecanismes implicats en l'activació d'aquestes cèl·lules, encara no estan clars quin són els elements claus que regulen la seva proliferació i migració i per tant la recerca de quins gens regulen aquests processos és d'especial interès (Taylor AM. i McNamara CA. 2003).

La tècnica de visualització diferencial (*differential display*, DD) ha sigut utilitzada àmpliament per la identificació de nous gens implicats en processos en els quals abans es desconeixia la seva funció (Liang P. 2002). Per aquesta raó, nosaltres vam decidir usar aquesta tècnica per identificar gens involucrats en l'activació de CML.

Mitjançant aquesta aproximació hem trobat que l'expressió del gen NOR-1 es troba augmentada quan CML són tractades amb un poderós mitogen com és el sèrum. L'expressió de NOR-1 és transitòria i no depèn de la síntesis *de novo* de proteïnes, fets que el defineixen com un gen de resposta primerenca (*early gene*), tal com s'ha descrit en altres tipus cel·lulars (Hedvat CV i Irving SG, 1995, Borghaei RC. *et al.* 1998, Pirih FQ. *et al.* 2003).

A més a més el sèrum també fa augmentar la unió de proteïnes nuclears a una seqüència de DNA, la NBRE, a la qual NOR-1 s'hi pot unir (Ohkura N. *et al.* 1994, Hedvat CV i Irving SG, 1995), fet que suggereix que l'increment de missatger

correspon a un augment d'activitat de la proteïna. Encara que, el no disposar d'anticossos específics contra NOR-1, no ens permet afirmar que tota la proteïna nuclear responsable del retardament del DNA correspon a NOR-1, ja que els altres membres de la família de NFGI-B també s'hi poden unir (Wilson TE. *et al.* 1991, Scarce LM. *et al.* 1993).

Diversos components presents en el sèrum poden induir l'expressió de NOR-1 quan es van analitzar de forma aïllada, com són diferents factors de creixement i LDL. Entre els factors de creixement analitzats s'ha de destacar el PDGF, la trombina i en menor mesura l'EGF. Els dos primers s'alliberen en grans quantitats quan es forma un trombe ja que són o bé produïts en la cascada de coagulació com és el cas de la trombina o en l'activació plaquetar com és el cas del PDGF (Badimon L. *et al.* 1994). La producció d'un trombe, com ja s'ha comentat en la introducció, desencadena importants processos de remodelatge en la placa així com activació de CML a través de l'expressió de diferents gens. NOR-1 podria ser un d'aquests gens, ja que com comentarem més endavant, regula la proliferació de les CML.

Per altre banda, concentracions elevades en plasma de LDL són un important factor de risc per desenvolupar aterosclerosis (Verschuren WM. *et al.* 1995). Les LDL poden exercir diferents efectes en CML com induir vies pro-mitogèniques (Gouni-Berthold I. *et al.* 2002), encara que es desconeixen molts dels efectes que realitzen a nivell molecular. Nosaltres vam observar que les LDL natives indueixen l'expressió de NOR-1 a les CML a uns nivells comparables a com ho fa el sèrum, aquest efecte està notablement reduït quan les LDL són modificades per oxidació. Les VLDL, les quals també poden induir diferents vies mitogèniques en CML (Lipskaia L. *et al.* 2003), també indueixen l'expressió de NOR-1 encara que a un nivell clarament inferior al que efectuen les LDL.

En resum podem dir que l'expressió de NOR-1 es veu induïda en CML per diferents factors que tenen importants vinculacions en el desenvolupament de l'aterosclerosis com poden ser les LDL, la trombina o el PDGF.

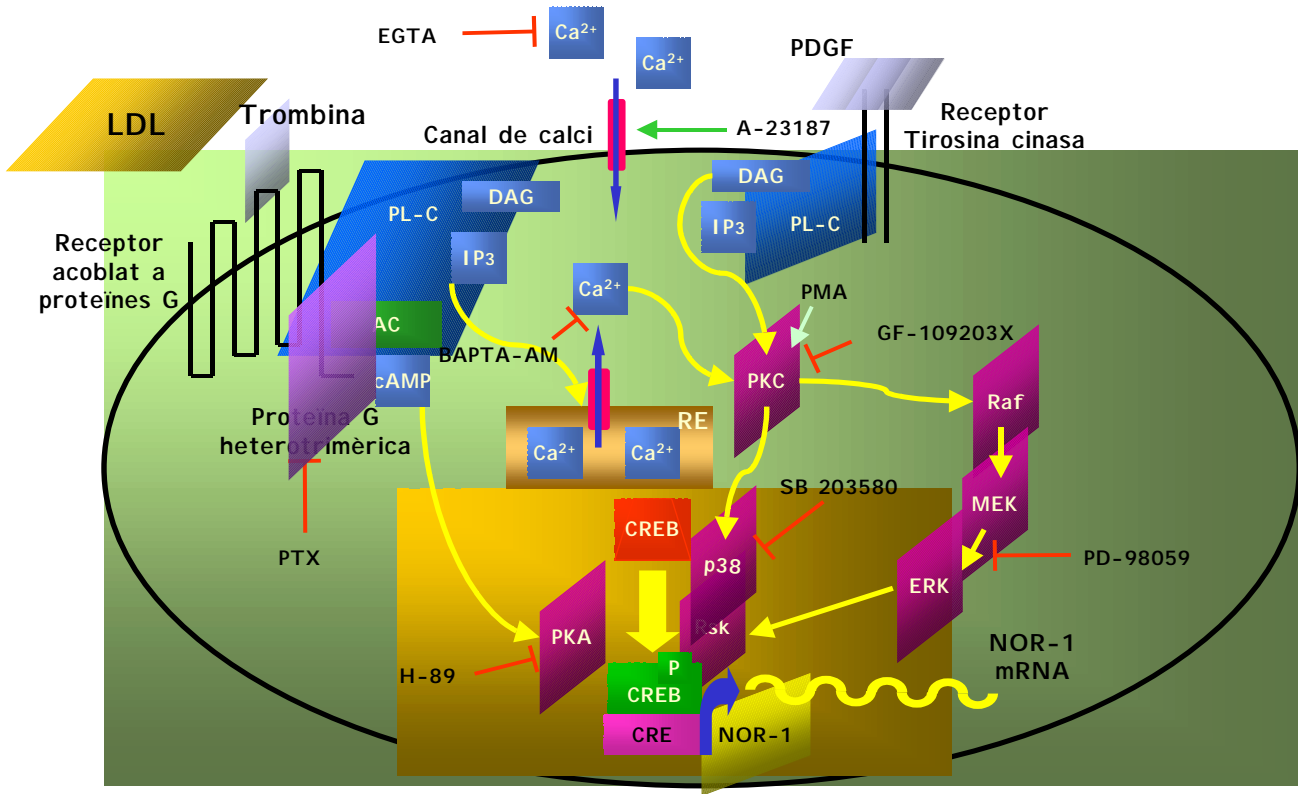
VIES DE TRANSDUCCIÓ DE SENYALS INVOLUCRADES EN L'EXPRESSIÓ DE NOR-1

Els mecanismes per els quals aquestes substàncies poden activar NOR-1 són complexes i participen diferents vies de transducció de senyals. Tant el PDGF com la trombina tenen receptors d'alta afinitat a la membrana plasmàtica, els quals activen diferents vies de transducció de senyals que molt cops són redundants (Heldin CH. *et al.* 1981, Rasmussen UB. *et al.* 1991). Per exemple, en el cas del receptor del PDGF s'ha observat que tot i activar diferents vies de transducció de senyals, la majoria d'elles acaben induint l'expressió dels mateixos gens (Fombrough *et al.* 1999).

En el cas de les LDL, com ja s'ha comentat en la introducció, diferents components d'aquestes poden activar múltiples vies de transducció de senyals molts cops per mecanismes dependents de proteïnes G heterotrimèriques (Gouni-Berthold I. i Sachinidis A. 2002). Entre els components bioactius presents a les LDL que poden activar diferents vies de transducció de senyals es pot destacar diferents metabòlits d'esfingolípids com la S1P o la ceràmida.

Nosaltres hem observat que en la inducció de l'expressió de NOR-1 estan involucrades proteïnes G heterotrimèriques sensibles a toxina pertussis, alliberament de calci, activació de proteïnes cinases com la PKA, la PKC o diferents MAPK com l'ERK o la p38 MAPK i com a integrador d'aquestes vies de transducció de senyals el factor de transcripció CREB. Aquest regula l'expressió gènica unint-se a les seqüències CRE presents en els promotors dels seus gens diana. (Mayr B. i Montminy M. 2001).

En el promotor de NOR-1 hi ha tres seqüències CRE que en diferents tipus cel·lulars semblen ser claus per l'expressió d'aquest gen (Ohkura N. *et al.* 1998). Tant la trombina com el PDGF poden induir l'activació de CREB (Tukunou T. *et al.* 2001, Xing J. *et al.* 1998) i en aquest treball nosaltres hem demostrat per primer cop que les LDL també poden induir l'activació d'aquest factor de transcripció. Encara que un esquema en detall de com es produeix la seqüència d'esdeveniments que acaben produint l'activació de la transcripció del gen de NOR-1 és complexa, amb les dades que disposen es pot proposar un model de com aquest procés succeeix (Fig 1).



Vies de transducció de senyals implicades en l'expressió de NOR-1. El PDGF i la trombina s'uneixen amb alta afinitat a receptors de tirosina cinasa o acoblats a proteïnes G respectivament presents a la membrana plasmàtica. A la seva vegada diversos components bioquímics; LDL com la S1P també disposen de receptors acoblats a proteïnes G específics. Aquests receptors poden induir un augment de inòsitol trisfosfat i de diacilglicerol els quals són potents activadors de la PKC. La PKC pot activar diferents MAPK com la de la p38 MAPK o la de l'ERK. Na altre banda la producció de cAMP pot activar la PKA. Finalment aquestes proteïnes cinases poden fosforilar al factor de transcripció CREB que està unit al promotor de NOR-1. Un cop activat CREB promou el reclutament de la maquinaria de transcripció i l'expressió de NOR-1 al citosol endoplasmàtic.

Com ja s'ha comentat, la inducció de l'expressió de NOR-1 és sensible a la toxina pertussis i tant la trombina com les LDL poden activar a proteïnes G heterotrimèriques sensibles a aquesta toxina (Halenda SP. *et al.* 1986, Sachinidis A. *et al.* 1997). Les proteïnes G heterotrimèriques a la seva vegada poden activar a diferents vies de transducció de senyals com pot ser la formació d'inositol trifosfat (*inositol triphosphate*, IP₃) que provoca l'obertura de canals de calci del reticle endoplasmàtic, així com la formació de diacilglicerol (DAG) el quals conjuntament amb el calci activa potentment les PKC "clàssiques" (Toker A. 1998).

En el nostre model l'expressió de NOR-1 és fortament dependent de l'alliberament de calci, ja que mentre la presència d'un ionòfor de calci (l'A-23187) induïx l'expressió de NOR-1, tant un quelant extracel·lular de calci (l'EGTA) com un permeable a les membranes cel·lulars (el BAPTA-AM) i que per tant, pot quelar el calci intracel·lular, inhibeixen l'expressió de NOR-1. Així mateix vam observar que la PKC també juga un paper clau en aquest procés ja que el PMA, un potent inductor de la PKC, augmenta l'expressió de NOR-1 mentre que aquest procés és inhibit en presència d'un inhibidor de la PKC (el GF-1092203X).

Per la seva banda, la PKC pot activar a l'ERK i a la p38 MAPK (Johnson GL. *et al.* 1994, Gouni-Berthold I. i Sachinidis A. 2002, Gutkind JS. 2000) i inhibidors d'aquestes cinases bloquegen l'expressió de NOR-1 (el PD 98059 i el SB 203580 respectivament). A la seva vegada, factors de creixement com el PDGF activen la via de l'ERK a través de diferents mecanismes entre els quals també està involucrada la PKC (Pearson G. *et al.* 2001). Per altre banda l'expressió de NOR-1 també depèn de l'activitat de la PKA, cinasa involucrada en diferents efectes produïts per les LDL (Ha H. *et al.* 1998, Paulson AF. *et al.* 2000), ja que un inhibidor d'aquesta cinasa (el H-89) inhibeix l'expressió de NOR-1.

Com ja s'ha comentat el factor de transcripció CREB s'activa per fosforilació en la serina 133 davant l'acció de diferents proteïnes cinases com la PKA (Gonzalez GA. i Montminy M. 1989), així com per diferents MAPK com per la p38 MAPK directament o com l'ERK a través de la cinasa Rsk (Xing J. *et al.* 1998, Xing J. *et al.* 1996). Aquesta fosforilació li permet a CREB interaccionar amb CBP (Chrivia JC. *et al.* 1993).

CREB també disposa d'altres nivells de regulació a més a més de per fosforilació. Com ja s'ha comentat en la introducció, l'acetilació de CREB augmenta el temps que està fosforilat així com l'activitat transactivacional d'aquest (Michael LF *et al.* 2000, Lu Q. *et al.* 2003). Per altre banda també és necessària la presència d'una activitat histona deacetilasa per l'activació transcripcional de NOR-1 dependent de CREB (Fass DM. *et al.* 2003). A més a més, l'arginina metil transferasa CARM-1 pot regular l'activitat de CBP a través de la metilació de diferents residus d'arginina. Per una banda, la metilació del domini KIX de CBP, el qual es responsable de la unió amb CREB, desestabilitza l'estructura d'aquest i disminueix la unió de CBP amb CREB (Xu W. *et al.* 2001). Per altre banda la metilació de CBP per CARM-1 en diferents arginines fora del domini KIX fa augmentar l'activitat transcripcional dependent de receptors nuclears (Chevillard-Briet M. *et al.* 2002).

Nosaltres vam observar que CREB pot unir-se al promotor de NOR-1, encara que ni el sèrum ni les LDL canvien la quantitat de proteïna unida al DNA, fet que s'ha observat en altres tipus cel·lulars i que no resulta sorprenent des de que s'ha postulat que la fosforilació de CREB en la serina 133 no canvia l'afinitat d'aquesta proteïna pel DNA (Mayr B. i Montminy M. 2001). Per altre banda no vam observar que altres factors de transcripció amb cremallera de leucina s'unissin a aquesta zona del promotor de NOR-1. Entre aquests figuren el factor de transcripció ATF-2, el qual té una alta similitud estructural amb CREB i pot unir-se a seqüències CRE (Liu F. i Green MR. 1990) o altres com c-Fos com c-Jun. Aquests, en principi, es van caracteritzar com a factors de transcripció que s'unien, formant diferents tipus de dímers, a elements de resposta per a TPA (*TPA response element*, TRE), encara que també s'ha observat que poden unir-se amb elevada eficiència a seqüències CRE (Sassone-Corsi P. *et al.* 1988, Hirai S. i Yaniv M. 1989).

CREB és clau per l'expressió de NOR-1 ja que en experiments de gen reporter, l'eliminació de les seqüències d'unió a CREB presents en el promotor de NOR-1 ocasiona la pèrdua d'expressió del transgen com ja s'ha vist en altres tipus cel·lulars (Ohkura N. *et al.* 1997, Inuzuka H. *et al.* 2002). A més a més la sobreexpressió d'un dominant negatiu de CREB, el qual té una mutació puntual S133A que li permet unir-se al DNA però no ser fosforilat i d'aquesta manera perd la seva capacitat de transactivació (Gonzalez GA. i Montminy M. 1989), inhibeix l'activitat del promotor de NOR-1. Aquest efecte sembla que va més enllà de les CML ja que també el vam observar en les cèl·lules NIH 3T3 que són d'origen fibroblast. Totes aquestes dades ens permeten

postular un model en el qual l'activació de CREB, a través de varies vies de transducció de senyals, condueix a la inducció de l'expressió de NOR-1.

CREB pot jugar diferents papers a la cèl·lula ja que regula l'expressió de nombrosos gens involucrats en diferents processos cel·lulars que van des del metabolisme energètic a la proliferació cel·lular (Mayr B. i Montminy M. 2001). Els efectes de CREB sobre aquest últim procés sembla que és variable i depèn del tipus i context cel·lular. Per una banda CREB induïx l'expressió de gens claus per la progressió del cicle cel·lular com c-fos (Sassone-Corsi P. *et al.* 1988) o la ciclina D1 (Beier F. *et al.* 1999, Lee RJ. *et al.* 1999) així com s'ha vist que la inhibició de CREB bloqueja el creixement de diferents línies tumorals (Park YJ. *et al.* 1999). En les CML la situació sembla que és més complexa (Reusch JE i Klem DJ. 2003), ja que si bé s'ha vist que l'activació de CREB és essencial per l'expressió de la ciclina A i per la proliferació d'aquestes cèl·lules (Kothapalli D. *et al.* 2003, Tokunou T. *et al.* 2001), també s'ha observat que la proliferació està associada amb una disminució dels nivells de CREB tant totals com de proteïna fosforilada (Klemm DJ. *et al.* 2001, Lipskaia L. *et al.* 2003). Aquestes dades fan pensar que CREB podria tindre un paper dual en la proliferació de les CML, en que en un primer moment l'estímul mitogènic ocasionaria una activació de CREB i d'aquesta manera de l'expressió de gens pro-proliferatius seguits d'una altre fase en la qual es requeriria una disminució dels nivells de CREB.

Per altre banda, el fet que hagin vist que les LDL puguin regular l'activitat de CREB pot tindre una importància més enllà de la regulació de l'expressió de NOR-1 a causa dels diversos processos en els quals CREB està involucrat. Per exemple entre d'altres efectes que els abans descrits, recentment s'ha vinculat CREB en la supervivència a l'apoptosi en CML (Tokonou. T. *et al.* 2003).

Per tant la modulació de CREB podria ser important en el tractament de les diferents complicacions que causa hipercolesterolèmia i els dipòsits lipídics a la paret arterial.

NOR-1 REGULA LA PROLIFERACIÓ DE LES CML

Per analitzar el paper de NOR-1 en les CML vam decidir inhibir l'expressió de d'aquest gen usant oligodeoxinucleòtids (ODNs) antisentit, una tècnica àmpliament usada per inhibir l'expressió gènica (Gewirtz AM. *et al.* 1998, Golden T. *et al.* 2002). Per tal d'assegurar l'especificitat dels ODNs, es va decidir usar-ne dos de diferents. A més a més, vam poder observar que al tractar les cèl·lules amb aquests ODNs, l'expressió de NOR-1 induïda pel sèrum o les LDL es troba notablement disminuïda, fet que no succeeix en els cèl·lules tractades amb els corresponents ODNs sentit. Usant aquests ODNs vam poder observar que les cèl·lules on s'havia inhibit l'expressió de NOR-1 està significativament reduïda la incorporació de timidina tritiada, un marcador de síntesis *de novo* de DNA (Morris F. *et al.* 1955). Aquest efecte es va obtenir amb una magnitud similar a l'assolida quan es van usar un ODN anti c-fos, el qual s'ha usat amb èxit per inhibir la proliferació cel·lular (Leon Y. *et al.* 1995). El grau d'expressió de c-fos és proporcional al grau de proliferació tant *in vitro* com *in vivo* (Martínez-González J. *et al.* 1997, Indolfi C. *et al.* 1995) i per tant sembla ser un bon gen control per analitzar la importància d'un altre gen involucrat en aquest procés.

L'efecte inhibitori sobre la proliferació no sols es produeix en cèl·lules estimulades sinó també sobre la incorporació basal de timidina, fet no sorprenent ja que aquestes cèl·lules estan en un medi que conté un 0'4% de sèrum, fet els permet seguir creixent encara que ha una taxa molt menor que els cèl·lules estimulades.

Aquestes dades indiquen que NOR-1 és clau per la síntesis de DNA en les CML. Aquest efecte sembla que no depèn d'un inductor concret ja que estímuls que porten una gran varietat de components com el sèrum i les LDL, que a la seva vegada poden activar un ampli ventall de vies pro-mitogèniques, són sensibles a la inhibició de l'expressió de NOR-1.

Mitjançant citometria de flux vam observar que en les cèl·lules tractades amb un ODN antisentit per NOR-1 es produeix un augment en el percentatge d'aquestes que romanen a la fase G₀/G₁ així com una disminució de les que es troben en les fases S i G₂/M. A més a més no vam observar cap indicati d'apoptosi en aquestes cèl·lules, ja que no apareix la típica fracció cel·lular amb un contingut de DNA inferior al de les cèl·lules en G₀/G₁ que apareix quan hi ha cèl·lules en apoptosi (Fraker PJ. *et al.* 1995).

Per tant les dades obtingudes per citometria de flux són coherents a l'efecte observat en la incorporació de timidina i conjuntament ens fan concloure que NOR-1 és necessari per la proliferació de les CML.

Com ja s'ha comentat la proliferació excessiva de les CML sembla que està en l'origen en diferents patologies com és el cas de la restenosi post-angioplastia o de la fallida d'una derivació (*bypass*) amb un empelt venós (Dzau VJ. *et al.* 2002). Si bé en el tractament de la primera hi ha algun resultat prometedor, encara que preliminar, en el cas de la segona no existeix cap estratègia terapèutica efectiva (Bhargava B. *et al.* 2003). Per tant és important trobar noves dianes farmacològiques que permetin desenvolupar teràpies que millorin la prognosi en aquestes malalties.

Amb aquest objectiu vam analitzar el paper de NOR-1 en un model *in vitro* de reparació tissular ja que és precisament en complicacions d'aquest procés on està la base d'aquestes patologies. En aquest model vam poder observar que la inhibició de l'expressió de NOR-1 es tradueix en un menor potencial poder invasor de les CML de l'àrea lesionada.

A més a més NOR-1 s'expressa a la paret arterial després d'efectuar una angioplastia en el model porcí, model àmpliament emprat per estudiar aquests processos (Badimon L. 2001). Aquesta inducció és transitòria i amb una cinètica semblant a l'observada en cèl·lules en cultiu fet que suggereix que els resultats *in vitro* poden ser extrapolats a la situació *in vivo*. Per mitjà de la tècnica de RT-PCR *in situ* vam poder determinar que les cèl·lules que expressen NOR-1 estan situades a la mèdia. En artèries sanes, com és el cas dels animals que se'ls va aplicar aquesta intervenció, totes les cèl·lules de la mèdia són CML (Owens GK. 1996), per tant l'augment de l'expressió de NOR-1 induït per haver efectuat una angioplastia és produït per CML.

NOR-1 també és clau en la proliferació d'altres tipus cel·lulars (PonnioT *et al.* 2002), però a la seva vegada també s'estimula davant estímuls apoptòtics en neurones (Ohkura N. *et al.* 1994) i regula l'apoptosi en timòcits d'una manera redundat amb Nur77 (Cheng LE. *et al.* 1997). El fet que NOR-1 i Nur77 tinguin funcions redundants no sembla ser sorprenent des de el moment que poden unir-se als mateixos elements de resposta, NBRE i NuRE, encara que no amb la mateixa eficiència (Ohkura N. *et al.* 1994, Hedvat CV i Irving SG, 1995, Maira M. *et al.* 1999).

A pesar d'aquestes similituds sembla que a la paret vascular tenen funcions no tan sols diferents, sinó fins i tot oposades. Nur77 inhibeix la proliferació de CML i s'expressa sota estímuls apoptòtics (Arkenbout EK. *et al.* 2002, Watanabe W. *et al.*

2001). A més a més ratolins transgènics que sobreexpressen Nur77 a les CML presenten un menor grau de restenosi després d'haver patit una lesió mecànica a la paret arterial (Arkenbout EK. *et al.* 2002).

En les cèl·lules endotelials els tres membres de la família de NGFI-B (Nur77, NOR-1 i Nurr1) són induïts pel factor de creixement de l'endoteli vascular (*vascular endothelial growth factor*, VEGF) (Liu D. *et al.* 2003). A més a més, en aquestes cèl·lules Nur77, igual que el que succeeix en les CML, també inhibeix la proliferació (Arkenbout EK. *et al.* 2003).

El fet que NOR-1 i Nur77 tinguin diversos efectes en la paret arterial malgrat la seva capacitat d'unir-se als mateixos elements de resposta, pot ser degut a les propietats diferencials que també posseeixen entre si. Mentre Nur77 pot establir heterodímers de tipus permissius amb el RXR i així regular l'expressió gènica d'una manera depenent del lligand del RXR, el 9-cis RA, NOR-1 no ho pot fer (Zetterström RH. *et al.* 1996). Però, a més a més aquests dos receptors nuclears podrien antagonitzar directament els seus efectes competint directament pel DNA. Nur77 realitza heterodímers amb el RXR unint-se al DNA a uns elements de resposta a l'àcid retinoïc (*retinoc acid response element*, RARE) una mica diferents dels convencionals. Aquests estan constituïts de forma DR-5 en el qual la meitat de l'element de resposta on s'uneix Nur77 és en realitat un NBRE. A aquest element de resposta també podria unir-se NOR-1, en aquest cas com NOR-1 no pot heterodimeritzar amb RXR estaria actuant com un repressor transcripcional.

RXR participa en múltiples processos cel·lulars (Ahuja HS. *et al.* 2003) i és una diana molecular per previndre la proliferació tant de CML (Benson S. *et al.* 2000) com de cèl·lules transformades (Gottardis MM. *et al.* 1996), a més a més lligands sintètics del RXR s'estan usant en assaigs clínics pel tractament del càncer (Miles SA. *et al.* 2002). NOR-1, en canvi està involucrat en diferents translocacions cromosòmiques que poden provocar una conversió oncogènica (Labelle Y. *et al.* 1995, Panagopoulos I. *et al.* 1999, Sjogren H. *et al.* 1999, Sjogren H. *et al.* 2000). Aquesta podria estar ocasionada tant per un augment en l'activitat transactivadora de la proteïna fusionada, com per una nova funció adquirida per aquesta (Labelle Y. *et al.* 1999, Ohkura N. *et al.* 2001).

Per tant sembla que NOR-1 i Nur77 poden exercir papers diferents segons el tipus cel·lular que es tracti. El fet que encara no s'hagin caracteritzat gens que segueixin aquest model de regulació fa que no es pugui senyalar la seva importància fisiològica,

però podria ser un mecanisme elegant per el qual els membres de la família de NGFI-B regularien la transcripció.

POT SER NOR-1 UNA NOVA DIANA FARMACOLÒGICA EN EL TRACTAMENT DE L'ATEROSCLEROSIS?

Els receptors nuclears s'usen com a diana farmacològica en el tractament de diferents patologies com el cas del RAR en leucèmies, els receptors de glucocorticòids en processos inflamatoris, els PPARs en diabetes i aterosclerosis o els estrògens en el tractament de l'osteoporosi. També receptors nuclears fins fa poc orfes com el LXR o el FXR s'estan estudiant com a noves dianes farmacològiques pel tractament de l'aterosclerosis.

NOR-1 com tal com indiquen aquest resultat regula la proliferació de les CML i és un efector molecular de les LDL en aquestes cèl·lules. Totes aquestes dades fan que sembli ser una diana atractiva des de el punt de vista farmacològic.

Una possible dificultat a l'hora de trobar molècules que poguessin modular la seva activitat, és la seva possible manca d'un lligand clàssic de receptors nuclears (Baker KD. *et al.* 2003). Així i tot es podrien trobar molècules que reguessin la seva activitat unint-se a altres parts de la proteïna, d'especial interès podria ser el domini N-terminal si com sembla és el responsable de la unió a diferents cofactors (Wansa KD. *et al.* 2003). Una altre estratègia possible seria usar tècniques de teràpia gènica, encara que l'aplicació d'aquestes en la pràctica clínica està plantejant notables dificultats en l'actualitat (Juengst ET. 2003), encara es tenen moltes expectatives en que esdevinguin claus en el tractament de diferents patologies i entre elles les malalties cardiovasculars (Dzau VJ. 2003). Per tant es podria considerar inhibir l'expressió de NOR-1 tant per tècniques d'ODNs antisentit, usant RNAs curts d'interferència (*short interference RNA*, siRNA) o esquers (*decoys*) per segrestar NOR-1 i impedir que s'unís als seus elements de resposta.

En resum, sembla que podem considerar a NOR-1 com un bon candidat per ser una diana farmacològica en les patologies en que estigui involucrada una excessiva proliferació de les CML.

Expressió de NOR-1 a les CML:

- NOR-1 és induït en CML per diferents factors de creixement com la trombina i el PDGF, així com en menor mesura per l'EGF.
- Les LDL i en menor grau les VLDL augmenten l'expressió de NOR-1 a les CML.

Mecanismes moleculars implicats en l'expressió de NOR-1 a les CML:

- Les LDL indueixen l'expressió de NOR-1 a través de diferents vies de transducció de senyals entre les que s'inclouen proteïnes G sensibles a toxina pertussis, alliberament de calci i diferents proteïnes cinases com la PKA, la PKC, l'ERK i la p38 MAPK.
- Les LDL indueixen l'activació del factor de transcripció CREB.
- CREB s'uneix al promotor de NOR-1.
- L'activació transcripcional de NOR-1 induïda pel sèrum i les LDL és dependent de l'activació de CREB.

Paper de NOR-1 a les CML:

- NOR-1 regula la proliferació de les CML.
- NOR-1 s'expressa i està implicat en la reparació tissular.

 A

Ahuja HS, Szanto A, Nagy L, Davies PJ. *The retinoid X receptor and its ligands: versatile regulators of metabolic function, cell differentiation and cell death.* J Biol Regul Homeost Agents. 2003, 17:29-45

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, 19:6085-97.

Amento EP, Ehsani N, Palmer H, Libby P. *Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells.* Arterioscler Thromb. 1991, 11:1223-30.

Anitskchow N, Chalатов S. *Über experimentelle cholestereinöse und ihre Bedeutung für die Entstehung einiger pathologischer Prozesse.* Zentralbl Allg Pathol Pathol Anat 1913; 24:1

Aranda A, Pascual A. *Nuclear hormone receptors and gene expression.* Physiol Rev. 2001, 81:1269-304.

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, 106:1530-5

Arkenbout EK, Van Bragt M, Eldering E, Van Bree C, Grimbergen JM, Quax PH, Pannekoek H, De Vries CJ. *TR3 Orphan Receptor Is Expressed in Vascular Endothelial Cells and Mediates Cell Cycle Arrest.* Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2003 23:1535-40

 B

Badimon JJ, Fuster V, Chesebro JH, Badimon L. *Coronary atherosclerosis. A multifactorial disease.* Circulation. 1993 Mar; 87(3 Suppl): II3-16

Badimon L, Chesebro JH, Badimon JJ. *Thrombus formation on ruptured atherosclerotic plaques and rethrombosis on evolving thrombi.* Circulation. 1992, 86(6 Suppl):III74-85

- Badimon L, Meyer BJ, Badimon JJ. *Thrombin in arterial thrombosis*. Haemostasis. 1994, 24:69-80
- Badimon L. *Atherosclerosis and thrombosis: lessons from animal models*. Thromb Haemost. 2001, 86:356-65
- 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 113:731-42
- Beier F, Lee RJ, Taylor AC, Pestell RG, LuValle P. *Identification of the cyclin D1 gene as a target of activating transcription factor 2 in chondrocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999, 96:1433-8
- Benson S, Padmanabhan S, Kurtz TW, Pershadsingh HA. *Ligands for the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and the retinoid X receptor-alpha exert synergistic antiproliferative effects on human coronary artery smooth muscle cells*. Mol Cell Biol Res Commun. 2000, 3:159-64
- Bhargava G, Rifas L, Makman MH. *Presence of epidermal growth factor receptors and influence of epidermal growth factor on proliferation and aging in cultured smooth muscle cells*. J Cell Physiol. 1979, 100:365-74.
- 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, 12:1638-51
- Bonow RO, Smaha LA, Smith SC Jr, Mensah GA, Lenfant C. *World Heart Day 2002: the international burden of cardiovascular disease: responding to the emerging global epidemic*. Circulation. 2002, 106:1602-5
- 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, 251:334-8
- Braunwald E. *Shattuck Lecture- cardiovascular medicine at the turn of the millenium: triumphs, concerns and opportunities*. N Engl J Med 1995, 337:1360-1369
- Brown MS, Goldstein JL. *A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis*. Science. 1986, 232:34-47
- Bruschke AV, Kramer JR Jr, Bal ET, Haque IU, Detrano RC, Goormastic M. *The dynamics of progression of coronary atherosclerosis studied in 168 medically treated patients who underwent coronary arteriography three times*. Am Heart J. 1989, 117:296-305

 C

Campbell JH, Han CL, Campbell GR. *Neointimal formation by circulating bone marrow cells*. Ann N Y Acad Sci. 2001, 947:18-24

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. 1991:100-10

Chawla A, Repa JJ, Evans RM, Mangelsdorf DJ. *Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files*. Science. 2001, 294:1866-70.

Chen JD, Evans RM. *A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors*. Nature. 1995, 377:454-7

Chen JK, Hoshi H, McClure DB, McKeehan WL. *Role of lipoproteins in growth of human adult arterial endothelial and smooth muscle cells in low lipoprotein-deficient serum*. J Cell Physiol. 1986, 129:207-14

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, 16:1865-75

Chevillard-Briet M, Trouche D, Vandell L. *Control of CBP co-activating activity by arginine methylation*. EMBO J. 2002, 21:5457-66

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, 8:1069-77

Chrivia JC, Kwok RP, Lamb N, Hagiwara M, Montminy MR, Goodman RH. *Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP*. Nature. 1993 Oct 28;365(6449):855-9

Comb M, Birnberg NC, Seasholtz A, Herbert E, Goodman HM. *A cyclic AMP- and phorbol ester-inducible DNA element*. Nature. 1986, 323:353-6

 D

Davies MJ, Richardson PD, Woolf N, Katz DR, Mann J. *Risk of thrombosis in human atherosclerotic plaques: role of extracellular lipid, macrophage, and smooth muscle cell content*. Br Heart J. 1993 69:377-81

Davies PF, Ross R. *Mediation of pinocytosis in cultured arterial smooth muscle and endothelial cells by platelet-derived growth factor*. J Cell Biol. 1978, 79:663-71.

De Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA Jr, Shin WS, Liao JK. *Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines*. J Clin Invest. 1995, 96:60-8

Delerive P, De Bosscher K, Besnard S, Vanden Berghe W, Peters JM, Gonzalez FJ, Fruchart JC, Tedgui A, Haegeman G, Staels B. *Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1*. J Biol Chem. 1999, 274:32048-54

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, 278:47104-9

Durrington P. *Dyslipidaemia*. Lancet. 2003, 362:717-31

Dutil EM, Toker A, Newton AC. *Regulation of conventional protein kinase C isozymes by phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK-1)*. Curr Biol. 1998, 8:1366-75

Dzau VJ, Braun-Dullaeus RC, Sedding DG. *Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies*. Nat Med. 2002, 8:1249-56.

Dzau VJ. *Predicting the future of human gene therapy for cardiovascular diseases: what will the management of coronary artery disease be like in 2005 and 2010?* Am J Cardiol. 2003 92:32N-35N

E

Endemann G, Stanton LW, Madden KS, Bryant CM, White RT, Protter AA. *CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein*. J Biol Chem. 1993, 268:11811-11816

Esch F, Baird A, Ling N, Ueno N, Hill F, Denoroy L, Klepper R, Gospodarowicz D, Bohlen P, Guillemin R. *Primary structure of bovine pituitary basic fibroblast growth factor (FGF) and comparison with the amino-terminal sequence of bovine brain acidic FGF*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1985, 82:6507-11.

F

Fambrough D, McClure K, Kazlauskas A, Lander ES. *Diverse signaling pathways activated by growth factor receptors induce broadly overlapping, rather than independent, sets of genes*. Cell. 1999, 97:727-41

Fanjul A, Dawson MI, Hobbs PD, Jong L, Cameron JF, Harlev E, Graupner G, Lu XP, Pfahl M. *A new class of retinoids with selective inhibition of AP-1 inhibits proliferation*. Nature. 1994, 372:107-11

Fass DM, Butler JE, Goodman RH. *Deacetylase activity is required for cAMP activation of a subset of CREB target genes*. J Biol Chem. 2003, 278:43014-9

Fernandez-Ortiz A, Badimon JJ, Falk E, Fuster V, Meyer B, Mailhac A, Weng D, Shah PK, Badimon L. *Characterization of the relative thrombogenicity of atherosclerotic plaque components: implications for consequences of plaque rupture*. J Am Coll Cardiol. 1994, 23:1562-9

Fraker PJ, King LE, Lill-Elghanian D, Telford WG. *Quantification of apoptotic events in pure and heterogeneous populations of cells using the flow cytometer*. Methods Cell Biol. 1995, 46:57-76

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: 242-50

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: 310-8

Fuster V, Badimon J, Chesebro JH, Fallon JT. *Plaque rupture, thrombosis, and therapeutic implications*. Haemostasis. 1996, 26 (Suppl 4): 269-84.

 G

Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. *Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques*. J Clin Invest. 1994, 94:2493-503

Geng YJ, Libby P. *Evidence for apoptosis in advanced human atheroma. Colocalization with interleukin-1 beta-converting enzyme*. Am J Pathol. 1995, 147:251-66

Gershlick AH. *Treating atherosclerosis: local drug delivery from laboratory studies to clinical trials*. Atherosclerosis. 2002, 160:259-71.

Gewirtz AM, Sokol DL, Ratajczak MZ. *Nucleic acid therapeutics: state of the art and future prospects*. Blood. 1998, 92:712-36

Golden T, Dean NM, Honkanen RE. *Use of antisense oligonucleotides: advantages, controls, and cardiovascular tissue*. Microcirculation. 2002, 9:51-64

Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS. *Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1979, 76:333-337.

Gonzalez GA, Montminy M. *Cyclic AMP stimulates somastatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133*. Cell 1989, 59:675-680

Gordon D, Reidy MA, Benditt EP, Schwartz SM. *Cell proliferation in human coronary arteries*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990, 87:4600-4.

Gottardis MM, Lamph WW, Shalinsky DR, Wellstein A, Heyman RA. *The efficacy of 9-cis retinoic acid in experimental models of cancer*. Breast Cancer Res Treat. 1996, 38:85-96

Gouni-Berthold I, Sachinidis A. *Does the coronary risk factor low density lipoprotein alter growth and signaling in vascular smooth muscle cells?* FASEB J. 2002, 16:1477-87

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, 24:340:653-6

Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert JM, Argos P, Chambon P. *Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A*. Nature. 1986, 320:134-9.

Gutkind JS. *Regulation of mitogen-activated protein kinase signaling networks by G protein-coupled receptors*. Sci STKE. 2000, 2000:RE1

H

Ha H, Roh DD, Kirschenbaum MA, Kamanna VS. *Atherogenic lipoproteins enhance mesangial cell expression of platelet-derived growth factor: role of protein tyrosine kinase and cyclic AMP-dependent protein kinase A*. J Lab Clin Med. 1998, 131:456-65

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, 13:4852-9

Halenda SP, Volpi M, Zavoico GB, Sha'afi RI, Feinstein MB. *Effects of thrombin, phorbol myristate acetate and prostaglandin D2 on 40-41 kDa protein that is ADP ribosylated by pertussis toxin in platelets*. FEBS Lett. 1986, 204:341-6

Hamm HE. *The many faces of G protein signaling*. J Biol Chem. 1998, 273:669-672

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, 44:1569-76

Havel RJ. *The formation of LDL: mechanisms and regulation*. J Lipid Res. 1984, 25:1570-6

Hedvat CV, Irving SG. *The isolation and characterization of MINOR, a novel mitogen-inducible nuclear orphan receptor*. Mol Endocrinol. 1995, 9:1692-700.

Heldin CH, Westermark B, Wasteson A. *Specific receptors for platelet-derived growth factor on cells derived from connective tissue and glia*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1981, 78:3664-8

Hillebrands JL, Klatter FA, van den Hurk BM, Popa ER, Nieuwenhuis P, Rozing J. *Origin of neointimal endothelium and alpha-actin-positive smooth muscle cells in transplant arteriosclerosis*. J Clin Invest. 2001, 107:1411-22.

Hirai S, Yaniv M. *Jun DNA-binding is modulated by mutations between the leucines or by direct interaction of fos with the TGACTCA sequence*. New Biol. 1989, 1:181-91

Hollenberg SM, Weinberger C, Ong ES, Cerelli G, Oro A, Lebo R, Thompson EB, Rosenfeld MG, Evans RM. *Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA*. Nature. 1985, 318:635-41

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

Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. *SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver*. J Clin Invest. 2002, 109:1125-31

I

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, 92:1230-5

Inoue N, Ramasamy S, Fukai T, Nerem RM, Harrison DG. *Shear stress modulates expression of Cu/Zn superoxide dismutase in human aortic endothelial cells*. Circ Res. 1996, 79:32-7

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

J

Johnson GL, Gardner AM, Lange-Carter C, Qian NX, Russell M, Winitz S. *How does the G protein, Gi2, transduce mitogenic signals?* J Cell Biochem. 1994, 54:415-22

Johnson G, Lapadat R. *Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK and p38 protein kinases*. Science. 2002, 298:1911-12

Jones SM, Kazlauskas A. *Growth factor-dependent signaling and cell cycle progression*. FEBS Lett. 2001, 490:110-6.

Juengst ET. *What next for human gene therapy? Gene transfer often has multiple and unpredictable effects on cells*. BMJ. 2003, 326:1410-1

K

Kamei Y, Xu L, Heinzl T, Torchia J, Kurokawa R, Gloss B, Lin SC, Heyman RA, Rose DW, Glass CK, Rosenfeld MG. *CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors*. Cell. 1996, 85:403-14.

Karin M, Chang L. *AP-1--glucocorticoid receptor crosstalk taken to a higher level*. J Endocrinol. 2001 169:447-51

Katsuda S, Boyd HC, Fligner C, Ross R, Gown AM. *Human atherosclerosis. III. Immunocytochemical analysis of the cell composition of lesions of young adults*. Am J Pathol. 1992, 140:907-14.

Klemm DJ, Watson PA, Frid MG, Dempsey EC, Schaack J, Colton LA, Nesterova A, Stenmark KR, Reusch JE. *cAMP response element-binding protein content is a molecular determinant of smooth muscle cell proliferation and migration*. J Biol Chem. 2001, 276:46132-41

Kliwer SA, Lehmann JM, Willson TM. *Orphan nuclear receptors: shifting endocrinology into reverse*. Science. 1999, 284:757-60.

Kodama T, Reddy P, Kishimoto C, Krieger M. *Purification and characterization of a bovine acetyl low density lipoprotein receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1988, 85:9238-9242.

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, 546:121-6

Kornberg RD, Lorch Y. *Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome*. Cell. 1999, 98:285-94

Kothapalli D, Stewart SA, Smyth EM, Azonobi I, Pure E, Assoian RK. *Prostacyclin receptor activation inhibits proliferation of aortic smooth muscle cells by regulating cAMP response element-binding protein- and pocket protein-dependent cyclin a gene expression*. Mol Pharmacol. 2003, 64:249-58

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, 279:703-7

Kousteni S, Bellido T, Plotkin LI, O'Brien CA, Bodenner DL, Han L, Han K, DiGregorio GB, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS, Roberson PK, Weinstein RS, Jilka RL, Manolagas SC. *Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity*. Cell. 2001, 104:719-30

 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, 4:2219-26

Labelle Y, Bussieres J, Courjal F, Goldring MB. *The EWS/TEC fusion protein encoded by the t(9;22) chromosomal translocation in human chondrosarcomas is a highly potent transcriptional activator.* Oncogene. 1999, 18:3303-8

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.

Laudet V. *Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor.* J Mol Endocrinol. 1997, 19:207-26.

Lee RJ, Albanese C, Stenger RJ, Watanabe G, Inghirami G, Haines GK 3rd, Webster M, Muller WJ, Brugge JS, Davis RJ, Pestell RG. *pp60(v-src) induction of cyclin D1 requires collaborative interactions between the extracellular signal-regulated kinase, p38, and Jun kinase pathways. A role for cAMP response element-binding protein and activating transcription factor-2 in pp60(v-src) signaling in breast cancer cells.* J Biol Chem. 1999, 274:7341-50

Leon Y, Vazquez 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, 136:3494-503

Liang P. *A decade of differential display.* Biotechniques. 2002, 33:338-44

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

Libby P, Aikawa M. *Stabilization of atherosclerotic plaques: new mechanisms and clinical targets.* Nat Med. 2002 8:1257-62.

Libby P. *Inflammation in atherosclerosis.* Nature 2002, 420:868-74

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

Liu F, Green MR. *A specific member of the ATF transcription factor family can mediate transcription activation by the adenovirus E1a protein.* Cell. 1990, 61:1217-24

Lipskaia L, Pourci ML, Delomenie C, Combettes L, Goudouneche D, Paul JL, Capiod T, Lompre AM. *Phosphatidylinositol 3-kinase and calcium-activated transcription pathways are required for VLDL-induced smooth muscle cell proliferation*. *Circ Res*. 2003, 92:1115-22

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*. *J Biol Chem*. 2003, 278:15727-34

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, 19:6164-73.

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, 19:7549-57

Mangelsdorf DJ, Ong ES, Dyck JA, Evans RM. *Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway*. *Nature*. 1990, 345:224-9

Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, *et al*. *The nuclear receptor superfamily: the second decade*. *Cell*. 1995, 83:835-9.

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, 135:213-23

Mayr B, Montminy M. *Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB*. *Nat Rev Mol Cell Biol* . 2001, 2:599-609.

Metzler B, Li C, Hu Y, Sturm G, Ghaffari-Tabrizi N, Xu Q. *LDL stimulates mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 expression, independent of LDL receptors, in vascular smooth muscle cells*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999, 19:1862-71

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*. *Mol Cell Biol*. 2000, 20:1596-603

Miesfeld R, Rusconi S, Godowski PJ, Maler BA, Okret S, Wikstrom AC, Gustafsson JA, Yamamoto KR. *Genetic complementation of a glucocorticoid receptor deficiency by expression of cloned receptor cDNA*. *Cell*. 1986, 46:389-99.

Miles SA, Dezube BJ, Lee JY, Krown SE, Fletcher MA, Saville MW, Kaplan L, Groopman J, Scadden DT, Cooley T, Von Roenn J, Friedman-Kien A. *Antitumor activity of oral 9-cis-retinoic acid in HIV-associated Kaposi's sarcoma*. *AIDS*. 2002, 16:421-9

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, 83:6682-6

Morris F. Donald T. DeWayne R. *Studies of deoxyribonucleic acid biosynthesis in embryonic tissues with thymidine C¹⁴*. J Biol Chem. 1956, 220:627-37

 N

Nakata A, Nakagawa Y, Nishida M, Nozaki S, Miyagawa J, Nakagawa T, Tamura R, Matsumoto K, Kameda-Takemura K, Yamashita S, Matsuzawa Y. *CD36, a novel receptor for oxidized low-density lipoproteins, is highly expressed on lipid-laden macrophages in human atherosclerotic aorta*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1999, 19:1333-9

 O

O'Brien ER, Alpers CE, Stewart DK, Ferguson M, Tran N, Gordon D, Benditt EP, Hinohara T, Simpson JB, Schwartz SM. *Proliferation in primary and restenotic coronary atherectomy tissue. Implications for antiproliferative therapy*. Circ Res. 1993, 73:223-31.

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, 205:1959-65

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, 1308:205-14

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

Ohkura N, Yaguchi H, Tsukada T, Yamaguchi K. *The EWS/NOR1 fusion gene product gains a novel activity affecting pre-mRNA splicing*. J Biol Chem. 2002, 277:535-43

O'Nate SA, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. *Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily*. Science. 1995, 270:1354-7.

O'Nate SA, Boonyaratankornkit 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, 273:12101-8

Onitiri AC, Lewis B, Bentall H, Jamieson C, Wisheart J, Faris I. *Lipoprotein concentrations in serum and in biopsy samples of arterial intima: a quantitative comparison*. *Atherosclerosis*. 1976, 23:513-9

Owen GK. Role of alterations on the differentiated state of vascular smooth muscle cells in atherogenesis. A Fuster V, Ross R i Topol E.J eds. *Atherosclerosis and coronary artery disease*. Lippincott-Raven Publishers, Filadelfia, 1996

P

Panagopoulos I, Mencinger M, Dietrich CU, Bjerkehagen B, Saeter G, Mertens F, Mandahl N, Heim S. *Fusion of the RBP56 and CHN genes in extraskeletal myxoid chondrosarcomas with translocation t(9;17)(q22;q11)*. *Oncogene*. 1999, 18:7594-8

Park YG, Nesterova M, Agrawal S, Cho-Chung YS. *Dual blockade of cyclic AMP response element- (CRE) and AP-1-directed transcription by CRE-transcription factor decoy oligonucleotide. gene-specific inhibition of tumor growth*. *J Biol Chem*. 1999, 274:1573-80

Paulson AF, Lampe PD, Meyer RA, TenBroek E, Atkinson MM, Walseth TF, Johnson RG. *Cyclic AMP and LDL trigger a rapid enhancement in gap junction assembly through a stimulation of connexin trafficking*. *J Cell Sci*. 2000, 113:3037-49

Pearson G. Robinson F. Gibson B. Xu B. Karandikar M. Berman K. Cobb M. *Mitogen activated protein (MAP) kinase pathways regulation and physiological functions*. *Endocrine Reviews* 2001,22:153-183

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, 306:144-50

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, 17:5946-51

Pitas RE, *Expression of the acetyl low density lipoprotein receptor by rabbit fibroblasts and smooth muscle cells. Up-regulation by phorbol esters*. *J Biol Chem*. 1990, 265:12722-12727

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, 22:935-45

R

Rao GN, Baas AS, Glasgow WC, Eling TE, Runge MS, Alexander RW. *Activation of mitogen-activated protein kinases by arachidonic acid and its metabolites in vascular smooth muscle cells*. *J Biol Chem*. 1994, 269:32586-91.

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, 23:4162-73

Rasmussen UB, Vouret-Craviari V, Jallat S, Schlesinger Y, Pages G, Pavirani A, Lecocq JP, Pouyssegur J, Van Obberghen-Schilling E. *cDNA cloning and expression of a hamster alpha-thrombin receptor coupled to Ca²⁺ mobilization*. FEBS Lett. 1991, 288:123-8

Reid VC, Mitchinson MJ. *Toxicity of oxidised low density lipoprotein towards mouse peritoneal macrophages in vitro*. Atherosclerosis. 1993, 98:17-24

Reid VC, Hardwick SJ, Mitchinson MJ. *Fragmentation of DNA in P388D1 macrophages exposed to oxidised low-density lipoprotein*. FEBS Lett. 1993, 332:218-20.

Reusch JE, Klemm DJ. *Cyclic AMP response element-binding protein in the vessel wall: good or bad?* Circulation. 2003, 108:1164-6

Ricote M, Li AC, Wilson TM, Kelly CJ, Glass CK. *The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation*. Nature. 1998, 391:79-82

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, 22:1409-14

Rosette C, Karin M. *Ultraviolet light and osmotic stress: activation of the JNK cascade through multiple growth factor and cytokine receptors*. Science. 1996, 274:1194-7

Ross R. *The pathogenesis of atherosclerosis. A perspective for the 1990s*. Nature 1993; 362:801-809

Ross R. *The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s*. Nature. 1993, 362:801-9

Ross R. *Atherosclerosis- An inflammataory disease*. N Engl J Med. 1999, 340:115-26

 S

Sachinidis A, Mengden T, Locher R, Brunner C, Vetter W. *Novel cellular activities for low density lipoprotein in vascular smooth muscle cells*. Hypertension. 1990, 15:704-11

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, 52:389-97

Sachinidis A, Kettenhofen R, Seewald S, Gouni-Berthold I, Schmitz U, Seul C, Ko Y, Vetter H. *Evidence that lipoproteins are carriers of bioactive factors*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1999, 19:2412-21

Sap J, Munoz A, Damm K, Goldberg Y, Ghysdael J, Leutz A, Beug H, Vennstrom B. *The c-erb-A protein is a high-affinity receptor for thyroid hormone*. Nature. 1986, 324:635-40.

Sassone-Corsi P, Lamph WW, Kamps M, Verma IM. *fos-associated cellular p39 is related to nuclear transcription factor AP-1*. Cell. 1988, 54:553-60

Sassone-Corsi P, Visvader J, Ferland L, Mellon PL, Verma IM. *Induction of proto-oncogene fos transcription through the adenylate cyclase pathway: characterization of a cAMP-responsive element*. Genes Dev. 1988, 2:1529-38

Sata M, Saiura A, Kunisato A, Tojo A, Okada S, Tokuhisa T, Hirai H, Makuuchi M, Hirata Y, Nagai R. *Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis*. Nat Med. 2002, 8:403-9.

Scarce LM, Laz TM, Hazel TG, Lau LF, Taub R. *RNR-1, a nuclear receptor in the NGFI-B/Nur77 family that is rapidly induced in regenerating liver*. J Biol Chem. 1993, 268:8855-61

Shah PK. *Mechanism of plaque vulnerability and rupture*. J AM Coll Cardiol. 2003, 41:15S-22S.

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, 261:9721-6

Schule R, Rangarajan P, Kliewer S, Ransone LJ, Bolado J, Yang N, Verma IM, Evans RM. *Functional antagonism between oncoprotein c-Jun and the glucocorticoid receptor*. Cell. 1990 62:1217-26

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, 264:12582-9

Sjogren H, Meis-Kindblom J, Kindblom LG, Aman P, Stenman G. *Fusion of the EWS-related gene TAF2N to TEC in extraskeletal myxoid chondrosarcoma*. Cancer Res. 1999, 59:5064-7

Sjogren H, Wedell B, Meis-Kindblom JM, Kindblom LG, Stenman G, Kindblom JM. *Fusion of the NH2-terminal domain of the basic helix-loop-helix protein TCF12 to TEC in extraskeletal myxoid chondrosarcoma with translocation t(9;15)(q22;q21)*. Cancer Res. 2000 Dec 15;60(24):6832-5

T

Tabas I. *Consequences of cellular cholesterol accumulation: basic concepts and physiological implications*. J Clin Invest 2002, 110:905-911

Taylor AM, McNamara CA. *Regulation of vascular smooth muscle cell growth: targeting the final common pathway*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2003, 23:1717-20

Tkachuk VA, Kuzmenko YS, Resink TJ, Stambolsky DV, Bochkov VN. *Atypical low density lipoprotein binding site that may mediate lipoprotein-induced signal transduction*. Mol Pharmacol. 1994, 46:1129-37

Toker A. *Signaling through protein kinase C*. Front Biosci. 1998, 3:1134-47

Tokunou T, Ichiki T, Takeda K, Funakoshi Y, Iino N, Shimokawa H, Egashira K, Takeshita A. *Thrombin induces interleukin-6 expression through the cAMP response element in vascular smooth muscle cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2001, 21:1759-63

Tokunou T, Ichiki T, Takeda K, Funakoshi Y, Iino N, Takeshita A. *cAMP response element-binding protein mediates thrombin-induced proliferation of vascular smooth muscle cell*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2001, 21:1764-9

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, 108:1246-52

Topper JN, Cai J, Falb D, Gimbrone MA Jr. *Identification of vascular endothelial genes differentially responsive to fluid mechanical stimuli: cyclooxygenase-2, manganese superoxide dismutase, and endothelial cell nitric oxide synthase are selectively up-regulated by steady laminar shear stress*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996, 93:10417-22

 U

Ui M, Katada T. *Bacterial toxins as probe for receptor-G_i coupling*. Adv Second Messenger Phosphoprot Res. 1990, 24:63-69

 V

Verschuren W M, Jacobs D R, Bloemberg B P, Kromhout D, Menotti A, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Dontas A S, Fidanza F, *et al*. *Serum total cholesterol and long-term coronary heart disease mortality in different cultures. Twenty-five-year follow-up of the seven countries study*. JAMA. 1995, 274:131-136

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

Von Rokitsansky C: *A Manual of Pathological Anatomy, vol 4*. Berlin, Sydenham Society, 1852, p 261

W

Walsh DA, Perkins JP, Krebs EG. *An adenosine 3',5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle*. J Biol Chem. 1968 10 243:3763-5

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, 277:33001-11

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, 78:24776-90

Watanabe T, Yoshizumi M, Akishita M, Eto M, Toba K, Hashimoto M, Nagano K, Liang YQ, Ohike Y, Iijima K, Sudoh N, Kim S, Nakaoka T, Yamashita N, Ako J, Ouchi Y. *Induction of nuclear orphan receptor NGFI-B gene and apoptosis in rat vascular smooth muscle cells treated with pyrrolidinedithiocarbamate*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2001, 21:1738-44

Weinberger C, Thompson CC, Ong ES, Lebo R, Gruol DJ, Evans RM. *The c-erb-A gene encodes a thyroid hormone receptor*. Nature. 1986, 324:641-6.

Willy PJ, Mangelsdorf DJ. *Unique requirements for retinoid-dependent transcriptional activation by the orphan receptor LXR*. Genes Dev. 1997 1, 11:289-98.

Wilson TE, Fahrner TJ, Johnston M, Milbrandt J. *Identification of the DNA binding site for NGFI-B by genetic selection in yeast*. Science. 1991, 252:1296-300

Woronicz JD, Calnan B, Ngo V, Winoto A. *Requirement for the orphan steroid receptor Nur77 in apoptosis of T-cell hybridomas*. Nature. 1994, 367:277-81

X

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, 273:959-63

Xing J, Kornhauser JM, Xia Z, Thiele EA, Greenberg ME. *Nerve growth factor activates extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase pathways to stimulate CREB serine 133 phosphorylation*. Mol Cell Biol. 1998, 18:1946-55

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

Xu W, Chen H, Du K, Asahara H, Tini M, Emerson BM, Montminy M, Evans RM. *A transcriptional switch mediated by cofactor methylation*. Science. 2001, 294:2507-11

 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, 2:351-61

Yla-Herttuala S, Lipton BA, Rosenfeld ME, Sarkioja T, Yoshimura T, Leonard EJ, Witztum JL, Steinberg D. *Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991, 88:5252-6

Yokoya K, Takatsu H, Suzuki T, Hosokawa H, Ojio S, Matsubara T, Tanaka T, Watanabe S, Morita N, Nishigaki K, Takemura G, Noda T, Minatoguchi S, Fujiwara H. *Process of progression of coronary artery lesions from mild or moderate stenosis to moderate or severe stenosis: A study based on four serial coronary arteriograms per year*. *Circulation.* 1999, 100:903-9

Yusuf S, Reddy S, Ounpuu S, Anand S. *Global burden of cardiovascular diseases: part I: general considerations, the epidemiologic transition, risk factors, and impact of urbanization*. *Circulation.* 2001, 104:2746-53

 Z

Zetter BR, Antoniades HN. *Stimulation of human vascular endothelial cell growth by a platelet-derived growth factor and thrombin*. *J Supramol Struct.* 1979, 11:361-70.

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, 10:1656-66

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, 89:413-24

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, 18:473-80