

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA  
MOLECULAR

CONTROL DEL CICLO CELULAR Y FISIOPATOLOGÍA  
VASCULAR: PAPEL DE LOS SUPRESORES DE  
CRECIMIENTO P27KIP1 Y P53

SILVIA MARÍA SANZ GONZÁLEZ

UNIVERSITAT DE VALENCIA  
Servei de Publicacions  
2006

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 22 de Juny de 2006 davant un tribunal format per:

- D. Francisco Sánchez Madrid
- D<sup>a</sup>. Deborah Burks
- D<sup>a</sup>. Sagrario Ortega Jiménez
- D<sup>a</sup>. María Jesús Sanz Ferrando
- D<sup>a</sup>. María Pilar López García

Va ser dirigida per:

D. Vicente Andrés García

©Copyright: Servei de Publicacions  
Silvia María Sanz González

---

Depòsit legal:

I.S.B.N.:978-84-370-6638-7

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Artes Gráficas, 13 bajo

46010 València

Spain

Telèfon: 963864115



**Universidad de Valencia**

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

**Consejo Superior de Investigaciones Científicas**

**Instituto de Biomedicina de Valencia**

Laboratorio de Biología Vascolar

Departamento de Patología y Terapia Molecular y Celular



**Control del ciclo celular y fisiopatología  
vascular: Papel de los supresores de  
crecimiento p27<sup>Kip1</sup> y p53**

Tesis Doctoral  
Silvia María Sanz González  
Valencia, 2006





MINISTERIO  
DE EDUCACION  
Y CIENCIA



CONSEJO SUPERIOR  
DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS

INSTITUTO DE BIOMEDICINA DE VALENCIA  
Dr. Vicente Andrés García  
Unidad de Biología Vascolar  
Departamento de Patología y Terapia Molecular y Celular

**Vicente Andrés García**, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas,

CERTIFICO:

Que la presente Tesis Doctoral titulada: **Control del ciclo celular y fisiopatología vascular: Papel de los supresores de crecimiento celular p27<sup>Kip1</sup> y p53**, ha sido realizada por Doña Silvia M<sup>a</sup> Sanz González, Licenciada en Bioquímica por la Universidad de Valencia, bajo mi dirección y en mi laboratorio en el Instituto de Biomedicina de Valencia, perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Para que conste, en cumplimiento de la legislación, firmo el presente certificado en:

Valencia, a 15 de Febrero de 2006

Fdo: Dr. Vicente Andrés García



## AGRADECIMIENTOS

En este punto de mi carrera científica llega el momento de dar las gracias a todas esas personas que han ejercido un efecto positivo en mi formación.

En primer lugar quisiera dar las gracias a mi primera jefa, la Dra. María Pilar López, quien me abrió las puertas de su laboratorio cuando finalicé la carrera. Mi primer encuentro con las pipetas fuera de una clase práctica se lo debo a ella. Desde estas líneas, siempre te estaré agradecida.

Obviamente, quiero dar unas gracias muy especiales a mi director de Tesis, el Dr. Vicente Andrés García. Gracias por darme la maravillosa oportunidad de formar parte de su grupo de investigación, por guiarme durante estos años, pero sobre todo, por confiar en mí y porque en ningún momento me faltó su ayuda y apoyo. Es un placer trabajar contigo.

Al Dr. Miguel P. Soares, por acogerme en su laboratorio del Instituto Gulbenkian de Ciência, en Oeiras. A su equipo, Isabel, Ângelo, Gabriela, Mark, László, Sofia, Andreia, y las “peques” Mónica, Josina y Claudia, por hacerme la estancia más fácil. Hago extensivas las gracias a Iris, Santiago, Alexis y Nunu, por su ayuda en el manejo del citómetro y del microscopio confocal.

De mi estancia en Oeiras, además de la experiencia profesional, que fue muy grata, conservo la amistad de dos estupendas madrileñas. Bea y Ana. Gracias a las dos por vuestro cariño.

Volviendo a Valencia, quiero dar las gracias a mis compañeros de laboratorio de Biología Vasculat. En especial a María Jesús y a Herminia. A las nuevas adquisiciones (aunque algunos ya no son tan nuevos): Davi, Marian, Ángela, José María, Ana y José Javier. A los más veteranos, Kiko y Mariló, y a los que ya no están. De ellos, destacar a Raquel y a Naomi, por ayudarme directamente en dos de los proyectos de esta Tesis.

Por supuesto, no quiero olvidar dar las gracias a todos los compañeros del IBV que me han ayudado, se han preocupado por mi trabajo y han tenido una sonrisa para mí cada vez que nos hemos visto por el pasillo: Marta, Santi, Belén, Salo, Ana, Libia, Juanjo, Paqui, Paula, Celso, Clara, Fer, Sandra, Lourdes, Ada, Rosa, MC, Mari Carmen, Jose, Susi, Pili, Rafa, Cintia, Mari Paz, Marina ... Me gustaría destacar al Sr. Cubells por cuidar tan bien de “mis niños”, y a Manolo, porque gracias a él, la paginación de la Tesis provisional fue posible (y por supuesto por

su ayuda con todos los tropiezos que he tenido con la “informática” en estos años). A las chicas de administración, a Amparo, a los guardas de seguridad, a los chicos de mantenimiento.... Y a todos los que no he nombrado. ¡A todos gracias!

A mis amigas de químicas. Por estar ahí, aunque pase el tiempo. Laura, Vane, Vero, Merche y Esther. ¡Carpe Diem!

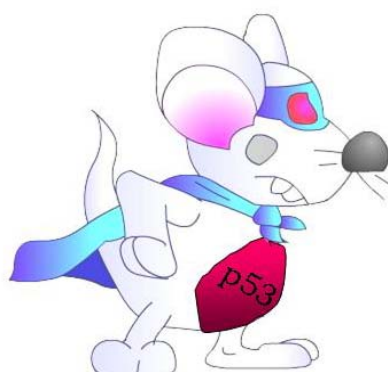
Por supuesto, a mis amigos bioquímicos. A Efra, amigo desde la etapa de químicas. A Vicente y Carlos, por los momentos compartidos dentro y fuera de clase. Pero sobre todo por las risas en los días de paellas y en todos los viajes. A MEG, un ejemplo de superación y fuerza de voluntad que veo todos los días, gracias por ser mi amiga, por estar siempre ahí. A Jota. Gracias por ser así, simpático, cariñoso y un artista. ¡Mi Súper p53 es Súper! A Amparo, tu mujer, por su dulzura y amistad sincera.

A mis amigos de toda la vida. Silvia, Óscar, Luzma y Javi. Por todos esos fantásticos momentos compartidos. De todo corazón, gracias por todo.

A Julia, mi gran amiga desde 3º de BUP. No sé que habría hecho sin ti. Tú también has sido un regalo en mi vida.

A Roberto. Los últimos años junto a ti han sido muy especiales.

A mi familia, por quererme y comprenderme. A mi tío Miguel, por interesarse por todo lo que hago, y darme ánimos (PPP, Pensamiento Positivo Permanente), a mi tía Clara, por su cariño. A mi tía Pili, mi tía Amparín y mi tío Carmelo, por su interés. A mi hermano y mi cuñada, porque sé que me quieren mucho (lo demostraron cuando vinieron a hacerme una visita a Oeiras, aguantando 40º al sol). A mis padres, que siempre han estado a mi lado demostrándome su cariño y apoyándome en todas las decisiones tomadas.





La autora de esta Tesis Doctoral ha sido beneficiaria de una Beca predoctoral CSIC-Empresa en el año 2000, y de una Beca predoctoral BEFI del Instituto de Salud Carlos III, del Ministerio de Salud y Consumo desde 2001 hasta 2005. Durante el último año de su Tesis, la doctoranda ha disfrutado de una beca con cargo al proyecto SAF2004-03057.

Este trabajo de Tesis Doctoral se ha realizado gracias a las siguientes ayudas:

- 1) Ciclo celular y arteriosclerosis: mecanismos reguladores e implicaciones patológicas (SAF2001-2358), Ministerio de Ciencia y Tecnología.
- 2) Factores de riesgo, evolución y tratamiento de las enfermedades cardiovasculares y sus mecanismos moleculares y celulares. Ayudas para el desarrollo de redes temáticas de investigación cooperativa, Red de Enfermedades Cardiovasculares, C03/01), Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo.
- 3) Bases moleculares de la arteriosclerosis inducida por hipercolesterolemia y diabetes. Identificación de nuevos marcadores de patología y de dianas terapéuticas usando abordajes de genómica y proteómica (SAF2004-03057), Ministerio de Educación y Ciencia.
- 4) Control molecular de la arteriosclerosis y desarrollo de nuevos abordajes terapéuticos (GV04B-288), Oficina de Ciencia y Tecnología, Generalitat Valenciana.



## ÍNDICE

|  |     |
|--|-----|
| <b>ABREVIATURAS</b>  | IX  |
| <b>CAPÍTULO 1: Introducción</b> .....  | 1   |
| 1. Ciclo celular en mamíferos.....   | 3   |
| 1.1 Papel de p27 <sup>Kip1</sup> en el control del ciclo celular.....                                  | 6   |
| 1.2 Papel de p53 en el control del ciclo celular.....  | 10  |
| 2. Remodelado vascular patológico: aterosclerosis y lesión<br>vascular inducida por daño mecánico..... | 13  |
| 2.1 Pared vascular y componentes celulares.....  | 14  |
| 2.2 Progresión de la placa de ateroma.....   | 16  |
| 2.3 El ratón deficiente en apolipoproteína E como modelo<br>experimental de aterosclerosis.....        | 18  |
| 2.4 Lesión mecánica de la pared vascular.....  | 20  |
| 2.5 Importancia de la proliferación celular durante<br>el remodelado vascular patológico.....          | 21  |
| 2.5.1 Papel de p27 <sup>Kip1</sup> en la hiperplasia de la neoíntima....                               | 23  |
| 2.5.2 Papel de p53 en la hiperplasia de la neoíntima.....  | 26  |
| <b>CAPÍTULO 2: Justificación del trabajo y objetivos</b> .....   | 33  |
| <b>CAPÍTULO 3: Resultados</b> .....  | 39  |
| Trabajo 1.....   | 41  |
| Trabajo 2.....   | 53  |
| Trabajo 3.....   | 63  |
| Trabajo 4.....   | 75  |
| <b>CAPÍTULO 4: Resumen y discusión general</b> .....   | 99  |
| <b>CAPÍTULO 5: Conclusiones</b> .....  | 113 |
| <b>CAPÍTULO 6: Bibliografía</b> .....  | 117 |



## ABREVIATURAS

- APTC:** angioplastia percutánea transluminal coronaria  
**apoE:** apolipoproteína E  
**apoE-KO:** ratón deficiente en apo E  
**CE:** célula endotelial  
**CDK :** quinasa dependiente de ciclina (“**Cyclin-Dependent Kinase**”)  
**CKI:** inhibidor de CDK (“**Cyclin-dependent Kinase Inhibitor**”)  
**CMLV:** célula de músculo liso vascular  
**ERK:** quinasa regulada por señales extracelulares (**Extracellular signal-Regulated Kinase**)  
**HDL:** lipoproteína de alta densidad (“**High-Density Lipoprotein**”)  
**LDL:** lipoproteína de baja densidad (“**Low-Density Lipoprotein**”)  
**MAPK:** quinasa activada por mitógenos (“**Mitogen-Activated Protein Kinase**”)  
**MEFs:** fibroblastos embrionarios murinos primarios  
**MEK:** quinasa de la quinasa regulada por mitógenos (“**MAPK kinase**”)  
**p27S10A:** ratón “knock-in” con la **Serina 10** de p27<sup>Kip1</sup> mutada a **Alanina**  
**p27T187A:** ratón “knock-in” con la **Treonina 187** de p27<sup>Kip1</sup> mutada a **Alanina**  
**p27T187-P:** p27<sup>Kip1</sup> fosforilado en el residuo **Treonina 187**  
**PDGF:** factor de crecimiento derivado de plaquetas (“**Platelet Derived-Growth Factor**”)  
**Rb:** retinoblastoma  
**RLDL:** receptor de lipoproteína de baja densidad  
**S10:** serina 10  
**T157:** treonina 157  
**T187:** treonina 187  
**TMO:** trasplante de médula ósea  
**VLDL:** lipoproteína de muy baja densidad (“**Very Low-Density Lipoprotein**”)



# **CAPÍTULO 1**

## **INTRODUCCIÓN**





## 1. Ciclo Celular en Mamíferos

La regulación del ciclo celular, proceso por el cual una célula se duplica y da lugar a dos células hijas, es un aspecto esencial durante todas las fases de desarrollo de los animales, desde el estadio de cigoto hasta el desarrollo postnatal. El ciclo celular se ha dividido arbitrariamente en 5 fases (**figura 1**):

- **G1**: es la fase inicial del ciclo durante la cual la célula se prepara para duplicarse.
- **S**: es la fase de replicación (síntesis) del ADN.
- **G2**: es la fase en la que se comprueba que la duplicación del material genético ha sido correcta antes de pasar a la fase siguiente. Si hay errores importantes que no pueden corregirse, la célula inicia el proceso de muerte celular por apoptosis.
- **M**: es la fase de mitosis que da lugar a las dos células hijas.
- **GO**: es la fase adicional del ciclo celular en la que la célula se encuentra en un estado de reposo. Si no ha iniciado la replicación del ADN, la célula puede “detenerse” en G1 y permanecer en estado de reposo durante días, semanas o incluso años si no recibe estímulos mitogénicos.

El control del ciclo celular está regulado por la acción de al menos tres familias de proteínas altamente especializadas: las ciclinas, las proteínas quinasas dependientes de ciclinas (CDKs, de cyclin-dependent protein kinases), y las CKIs, proteínas que actúan como inhibidores de CDKs.

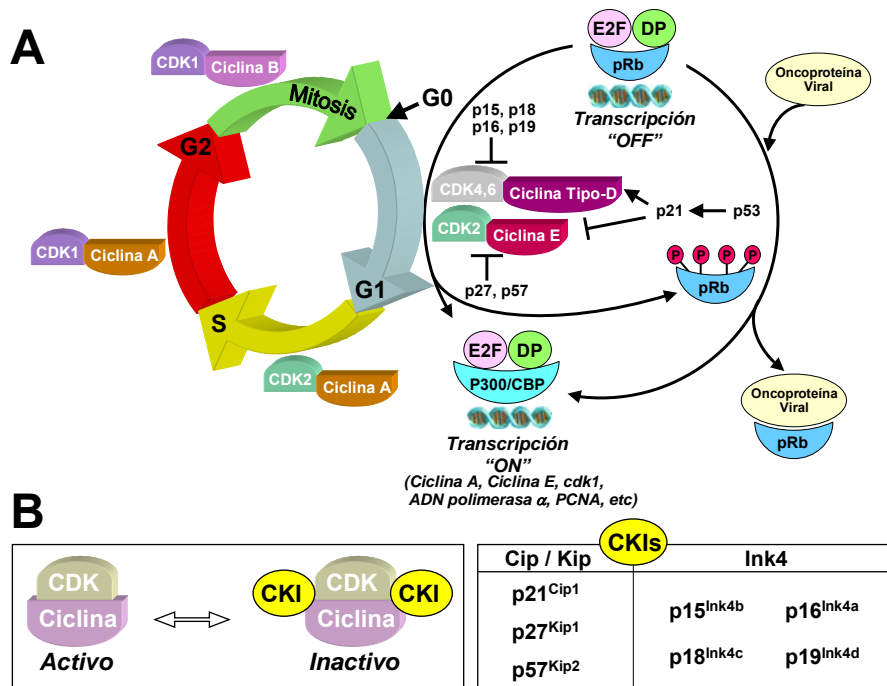
Las **ciclinas**, llamadas así porque sufren un ciclo de síntesis y degradación en el transcurso de cada división celular, (Evans et al., 1983; Pines, 1995) se unen a las CDKs y controlan su capacidad para fosforilar las proteínas dianas. Pueden clasificarse en:

Ciclinas mitóticas (ciclina A y ciclina B) que se unen a CDKs durante las fases S, G2 y M temprana y son necesarias para entrar en mitosis.

Ciclinas G1 (ciclina D1, D2 y D3 y ciclina E1 y E2), que se unen a CDK durante G1 y son necesarias para entrar en la fase S.

Las **CDKs** son las quinasas que se activan mediante la unión a ciclinas. Los complejos CDK/ciclina activados fosforilan proteínas en residuos de serinas y treoninas, permitiendo así la progresión del ciclo celular. En la mayoría de las células de mamíferos se expresan al menos 5 CDKs: CDK1, CDK2, CDK3, CDK4 y CDK6.

Las **CKIs** son proteínas que se unen a las CDKs regulando negativamente su actividad. En función de su estructura y función, las CKIs se clasifican en dos familias: a) La familia INK (p15<sup>Ink4b</sup>, p16<sup>Ink4a</sup>, p18<sup>Ink4c</sup> y p19<sup>Ink4d</sup>), caracterizada por tener múltiples repeticiones de dominios anquirinas y por inhibir específicamente las quinasas CDK4 y CDK6; y b) La familia CIP/KIP (p21<sup>Cip1/WAF1</sup>, p27<sup>Kip1</sup> y p57<sup>Kip2</sup>), caracterizada por tener un amplio espectro de inhibición, aunque son más activas contra la quinasa CKD2 que contra las quinasas CDK4 y CDK1. Tienen un dominio común aminoterminal inhibitor de CDK/ciclina, y un dominio carboxiterminal divergente, tanto estructural como funcionalmente.



**Figura 1: Proteínas implicadas en el control del ciclo celular en mamíferos. A)** La progresión a través de G1/S está controlada de modo secuencial por la activación ordenada de distintos complejos ciclina-CDK. La estimulación por mitógenos activa los holoenzimas ciclina D-CDK4/6 y ciclina E-CDK2, los cuales provocan la hiperfosforilación de la proteína Rb y la liberación del factor de transcripción E2F, el cual permite la transcripción de genes necesarios para la progresión del ciclo. Entre estos, se induce la expresión de la ciclina A, que al interactuar con CDK2 permite la progresión a través de la fase S de síntesis de ADN. Más tarde, durante la fase G2, la ciclina A forma complejo con CDK1. Durante la fase M actúa el holoenzima formado por ciclina B1-CDK1. **B)** Existen dos familias de inhibidores de CDKs, la INK y la CIP/KIP.

Durante G1 los mitógenos inducen la expresión de ciclinas de tipo D que se unen a las quinasas CDK4 y CDK6 (Sherr, 1993). Estos holoenzimas secuestran CKIs, disminuyendo así los niveles de inhibidor libre, y fosforilan la proteína del retinoblastoma (Rb) y proteínas “pocket” relacionadas (p107 y p130), provocando su inactivación. Se libera entonces el factor de transcripción E2F, permitiendo así la activación de genes necesarios para la entrada en fase S, como son la ciclina E y la ciclina A. Una vez terminada la fase M, las células entran nuevamente en G1, disminuyen los niveles de los holoenzimas ciclina-CDK, se defosforila y activa la proteína Rb, que interacciona e inactiva E2F hasta la llegada de nueva fuente mitogénica y comienzo de un nuevo ciclo de división celular.

Actualmente, el modelo tradicionalmente aceptado de que la mayoría de las ciclinas y CDK son esenciales para la proliferación celular está siendo replanteado en mamíferos a consecuencia de los últimos descubrimientos obtenidos del análisis de ratones modificados genéticamente para ciclinas, CDK y CKIs. Inesperadamente, la mayoría de los holoenzimas ciclina-CDK son dispensables para la proliferación celular, debido a un elevado nivel de redundancia funcional, promiscuidad y/o mecanismos compensatorios. Brevemente, la mayoría de los tejidos embrionarios no requieren la actividad de complejos ciclina D-CDK4/6. Además, se ha demostrado que la CDK2 es dispensable para la proliferación y desarrollo somático, aunque es esencial en meiosis. La ciclina E es dispensable para sí no todo, la mayoría del desarrollo embrionario, aunque sigue siendo requerida para la función placentar. Muy recientemente, Santamaría y Ortega han revisado con detalle el efecto de la manipulación de genes de ciclo celular en el ratón (Santamaria and Ortega, 2006).

Por su relevancia para los estudios desarrollados en esta Tesis Doctoral, en los siguientes apartados se discute el papel de la CKI p27<sup>Kip1</sup> y del gen supresor de tumores p53 en el control del ciclo celular.

## 1.1 Papel de p27<sup>Kip1</sup> en el control del ciclo celular.

Los niveles de p27<sup>Kip1</sup> se encuentran normalmente elevados durante la fase G0/G1 y disminuyen rápidamente por acción de mitógenos, permitiendo que las células entren en la fase S. Entre los factores mitogénicos destacan ciertas hormonas y los factores de crecimiento. Por el contrario, existen señales fisiopatológicas que provocan la quiescencia celular aumentando los niveles de p27<sup>Kip1</sup>, como por ejemplo el factor de crecimiento tumoral  $\beta$  (TGF $\beta$ ), bajos niveles de suero, interleuquina-10, interferón $\gamma$  y diversas drogas citostáticas.

### Regulación de p27<sup>Kip1</sup>.

La abundancia de p27<sup>Kip1</sup> está controlada por múltiples mecanismos, a saber: a) inactivación por interacción con otras proteínas (Sherr and Roberts, 1999); b) mecanismos transcripcionales (Servant et al., 2000); c) mecanismos traduccionales (Hengst and Reed, 1996; Millard et al., 1997; Miskimins et al., 2001); y d) proteólisis.

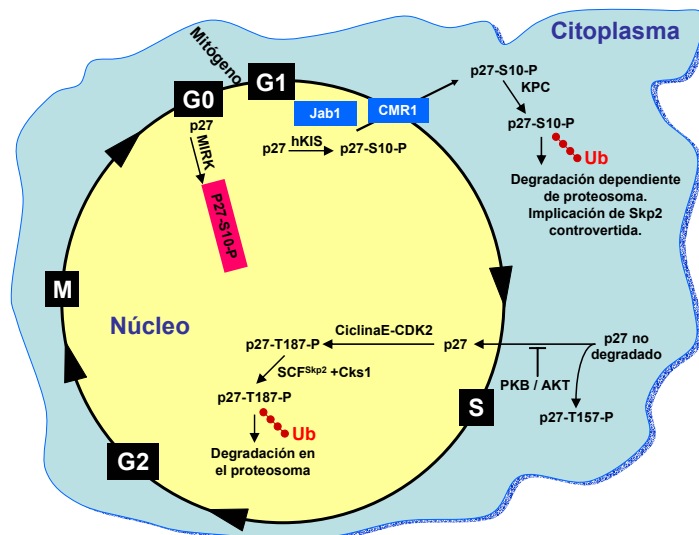
Se ha demostrado que las rutas que regulan p27<sup>Kip1</sup> por debajo de la cascada de señalización de Ras son diferentes en las distintas fases del ciclo celular (Sa and Stacey, 2004). Por un lado, inhibidores de la quinasa quinasa activada por mitógeno (MEK) y de la fosfato inositol 3 quinasa (PI3K), inducen la expresión de p27<sup>Kip1</sup> en la fase G1. Por otra parte, inhibidores de la actividad de la proteína quinasa B (PKB o AKT) inducen la acumulación de p27<sup>Kip1</sup> en la fase S. Estas observaciones proporcionan una conexión molecular entre vías de transducción de señales y control de ciclo celular mediado por p27<sup>Kip1</sup>.

Se han descrito tres mecanismos de proteólisis de p27<sup>Kip1</sup> que ocurren secuencialmente durante la progresión del ciclo celular (**figura 2**): a) degradación en el citoplasma durante G1 (Malek et al., 2001); b) degradación en el núcleo durante la transición G1/S (Pagano et al., 1995); y c) degradación en el estado de quiescencia (Besson et al., 2006).

En cultivos celulares mantenidos en ausencia de suero, p27<sup>Kip1</sup> es fosforilado en la serina 10 (S10) en la fase G0/G1 temprana por acción de la quinasa Mirk/dyrk1B (Deng et al., 2004). Esta fosforilación conduce a una estabilización de la proteína fosforilada, que se mantiene en el núcleo en G0. En presencia de mitógenos, la quinasa hKIS (de human kinase interacting stathmin) fosforila a p27<sup>Kip1</sup> en la S10, exportándose entonces p27<sup>Kip1</sup> fosforilado al citoplasma (Boehm et al., 2002). Se ha demostrado que en este proceso participan los complejos CRM1 (Connor et al., 2003; Ishida et al., 2002) y COP9 signalosoma/Jab1 (CSN5). Se ha postulado que Jab1 actuaría como un adaptador entre p27<sup>Kip1</sup> y CMR1 para inducir el transporte al citoplasma (Tomoda et al., 2002; Tomoda et al., 1999). Muy recientemente se ha

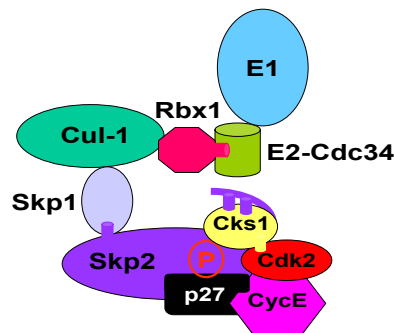
demostrado que Jab1 requiere de la interacción directa con la proteína p8 para inducir la translocación de p27<sup>Kip1</sup> al citoplasma (Malicet et al., 2006). Una vez translocada, al citoplasma, p27<sup>Kip1</sup> se ubiquitina por acción del complejo KPC (de “Kip1 ubiquitilation-promoting complex”) y se degradada en el proteasoma (Kamura et al., 2004).

Estudios recientes han arrojado controversia sobre el papel de la fosforilación de S10 para el transporte de p27<sup>Kip1</sup> del núcleo al citoplasma. Así, analizando el ratón “knock-in” en el que la S10 de p27<sup>Kip1</sup> se ha mutado a alanina (ratón p27S10A), Kotake y colaboradores demostraron que la fosforilación en S10 era efectivamente importante para la estabilidad de la proteína en G0, pero no para su salida al citoplasma (Kotake et al., 2005). Por el contrario, Besson y colaboradores han mostrado recientemente que la mutación a alanina en este residuo impide el transporte de p27<sup>Kip1</sup> al citoplasma (Besson et al., 2006).



**Figura 2: Mecanismos de proteólisis de p27<sup>Kip1</sup> en el citoplasma durante la fase G1 y en el núcleo durante la transición G1/S.** La fosforilación en S10 representa aproximadamente el 70% de p27<sup>Kip1</sup> fosforilado. En G0, la fosforilación en S10 por acción de MIRK mantiene a p27<sup>Kip1</sup> en el núcleo. En presencia de mitógenos hKIS fosforila a p27<sup>Kip1</sup> en la S10 y, con la participación de CMR1 y Jab1, se transporta al citoplasma, se ubiquitina por el complejo promovedor de ubiquitinación Kip-1 (KPC) y se degrada en el proteasoma. El descenso en los niveles de p27<sup>Kip1</sup> permite la activación de ciclina E-CDK2. En el núcleo, los complejos ciclina E-CDK2 activos fosforilan p27<sup>Kip1</sup> en T187, provocando su ubiquitinación por el complejo SCF<sup>Skp2</sup> y la proteína adaptadora Cks1, y su subsiguiente degradación en el proteasoma. La fosforilación de p27<sup>Kip1</sup> en el residuo T157 por acción de PKB/AKT impide su re-entrada al núcleo.

El segundo mecanismo proteolítico de degradación de  $p27^{Kip1}$  es el más estudiado y es dependiente de la fosforilación del residuo treonina en posición 187 (T187) y de la proteína Skp2. En el núcleo, el complejo ciclina E-CDK2 activado fosforila a  $p27^{Kip1}$  en T187 (Montagnoli et al., 1999; Morisaki et al., 1997; Sheaff et al., 1997; Vlach et al., 1997), de modo que la proteína queda marcada para ser ubiquitinada y degradada por la ruta del proteasoma (Pagano et al., 1995). La ubiquitinación está mediada por el complejo  $SCF^{Skp2}$  formado por las subunidades Cul-1, Skp1, Rbx1 y Skp2 (Carrano et al., 1999; Montagnoli et al., 1999; Nakayama et al., 2004; Nakayama et al., 2001; Tsvetkov et al., 1999). Además, se ha demostrado la participación de la proteína accesoria Cks1 (Ganoth et al., 2001; Spruck et al., 2001) que actuaría como puente entre  $p27^{Kip1}$  fosforilado, Skp2 y CDK2 (Hao et al., 2005; Ungermannova et al., 2005). Además se ha demostrado que la ubiquitinación de  $p27^{Kip1}$  requiere la interacción física con la ciclina E y reconocimiento de T187 fosforilado por  $SCF^{Skp2}$  (Ungermannova et al., 2005) (**figura 3**).



**Figura 3: Interacciones propuestas para la proteólisis nuclear de  $p27^{Kip1}$ .** Interacciones proteicas del complejo E3 ó  $SCF^{Skp2}$  (formado por Skp2, Skp1, Cul-1, Rbx1) con Cks1,  $p27^{Kip1}$  y ciclina E-CDK2. El contacto directo de  $p27^{Kip1}$  y la ciclina E, una vez el holoenzima ha fosforilado el residuo T187 de  $p27^{Kip1}$  es necesario para que el complejo  $SCF^{Skp2}$  ubiquitine a  $p27^{Kip1}$ . Este complejo precisa del adaptador Cks1, el cual interacciona con Skp2 y con la subunidad quinasa del holoenzima ciclina E-CDK2. Este complejo interacciona con el enzima E2-Cdc34 y éste a su vez con el enzima E1 de la maquinaria de ubiquitinación. Modelo según (Ungermannova et al., 2005).

La treonina 157 (T157) también juega un papel importante en la regulación de  $p27^{Kip1}$ . Este residuo es fosforilado en el citoplasma por acción de la proteína quinasa B (PKB/AKT), de manera que se impide la interacción de  $p27^{Kip1}$  con la importina  $\alpha$  y su transporte del citoplasma al núcleo (Liang et al., 2002; Shin et al., 2005).

Recientemente se ha demostrado la existencia de una tercera ruta de degradación proteolítica de p27<sup>Kip1</sup> dependiente de ubiquitinación en el estado quiescente de las células. Esta vía depende de la fosforilación en S10 y de la interacción de p27<sup>Kip1</sup> con los complejos ciclina-CDK (Besson et al., 2006).

### Ratón “knock in” p27<sup>T187A</sup>

Con el fin de estudiar el papel que juega la fosforilación de p27<sup>Kip1</sup> en T187 *in vivo*, Malek y colaboradores generaron un ratón “knock-in” en el que el gen p27<sup>Kip1</sup> endógeno se reemplazó por un mutante en el que la T187 se substituyó por alanina (**ratón p27<sup>T187A</sup>**) (Malek et al., 2001). El análisis de estos ratones permitió postular el mecanismo de proteólisis de p27<sup>Kip1</sup> en la fase G1 del ciclo celular que ocurre en el citoplasma (ver apartado anterior). Si bien el análisis por Western blot demostró niveles similares de p27<sup>Kip1</sup> al comparar diversos tejidos, en cultivos primarios de fibroblastos embrionarios (MEFs) se observó que las células que expresaban el mutante T187A no regulaban a la baja los niveles de p27<sup>Kip1</sup> durante la transición S/G2 del mismo modo que lo hacían las células con p27<sup>Kip1</sup> silvestre. La interpretación de estos resultados es que la ausencia de fosforilación en T187 bloquea el mecanismo proteolítico que opera en el núcleo durante la transición G1/S, sin verse afectada la degradación que tiene lugar en el citoplasma durante la fase G1 temprana.

Sorprendentemente, el efecto de bloquear la fosforilación de T187 sobre la proliferación fue dependiente del tipo celular. Así, experimentos *in vitro* demostraron una reducción de un 20-30% en la proliferación de fibroblastos derivados de ratones p27<sup>T187A</sup>, mientras que el efecto inhibitorio fue del 80% en células T CD4<sup>+</sup> esplénicas estimuladas (Malek et al., 2001). Del mismo modo, experimentos de proliferación de queratinocitos *in vivo* analizados a los 4.5 días después de producir heridas circulares punzantes en la piel, demostraron un retraso en el cierre de la herida en los ratones p27<sup>T187A</sup> como consecuencia de una disminución en el crecimiento de las células epiteliales. No obstante, en un segundo modelo, en el que la cicatrización se debe mayormente a una migración de células epiteliales, no se observaron diferencias en la curación de las heridas producidas por incisión. Recientemente, Kossatz y colaboradores analizaron el proceso de regeneración hepática en ratones p27<sup>T187A</sup> y deficientes en Spk2 y sugirieron que la capacidad de p27<sup>Kip1</sup> de parar el ciclo celular estaba limitada a un corto periodo en G1 (Kossatz et al., 2004).

Otro resultado inesperado es que, al igual que el ratón deficiente en p27<sup>Kip1</sup> (Fero et al., 1996; Kiyokawa et al., 1996; Nakayama et al., 1996),

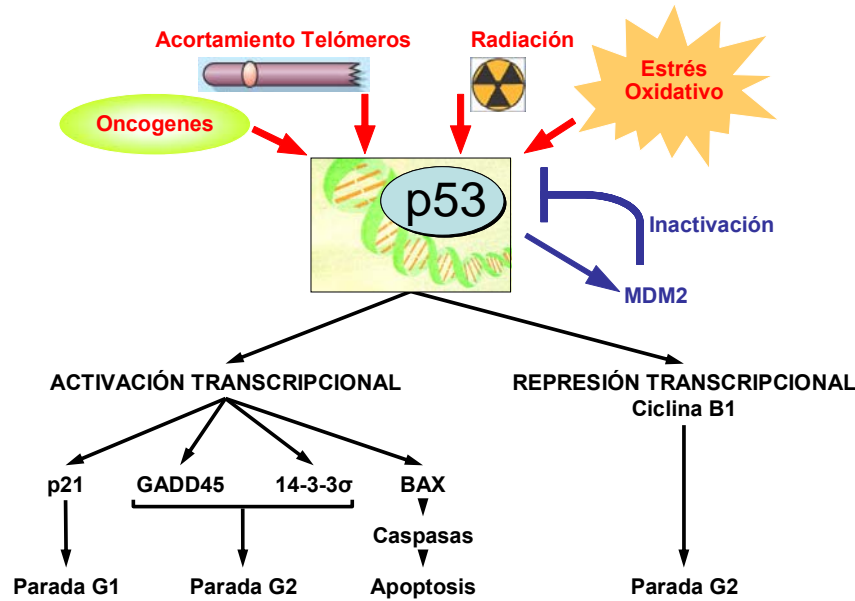
el ratón p27<sup>T187A</sup> presenta mayor peso corporal que el ratón silvestre (Malek et al., 2001). El fenotipo del ratón deficiente en p27<sup>Kip1</sup> se ha atribuido a la hipertrofia de diversos órganos debido a una mayor actividad proliferativa. En el caso del ratón p27<sup>T187A</sup>, no se ha demostrado el mecanismo responsable del aumento de su tamaño corporal.

## 1.2 Papel de p53 en el control del ciclo celular

Debido en parte a su actividad citostática, los genes supresores de tumores son componentes clave de la maquinaria celular de protección frente a procesos cancerosos (Hanahan and Weinberg, 2000). Los mecanismos que conducen a la inactivación de supresores tumorales incluyen procesos mutacionales estocásticos, genéticos y/o epigenéticos.

Entre los genes supresores de tumores, p53 fue el primer regulador del punto de restricción del ciclo celular descubierto en humanos. Se trata de un factor de transcripción ubicuo que en condiciones normales está latente e inactivo. Su baja concentración está mantenida por la ubiquitinación mediada por MDM2 y su posterior proteólisis (Haupt et al., 1997; Kubbutat et al., 1997). Sin embargo, cuando la célula se somete a estrés dañino (por ej., hipoxia, radiación ultravioleta, radiación  $\gamma$ , agentes químicos, estrés oncogénico, pérdida de telómeros, etc), p53 se activa, elevándose sus niveles y bloqueándose su degradación (**figura 4**). La activación de p53 conduce a un complejo programa de transcripción que, dependiendo del tipo celular y contexto en el que se lleva a cabo, provoca parada del ciclo celular, muerte celular programada, diferenciación, senescencia, reparación del ADN o inhibición de angiogénesis (Aloni-Grinstein et al., 1995; Atadja et al., 1995; Dameron et al., 1994). Estas acciones de p53 responden a una compleja red de mecanismos regulados, como son: a) activación transcripcional de genes pro-apoptóticos y anti-proliferativos (por ej., bax y p21<sup>Cip1/WAF1</sup>, respectivamente); b) represión transcripcional de genes pro-proliferativos y anti-apoptóticos (por ej., IGF-II y bcl2, respectivamente); y c) interacciones con proteínas reguladoras (por ej., helicasas y caspasas).





**Figura 4: p53 y control del ciclo celular.** Tras un insulto celular (por ej., pérdida de telómeros, activación oncogénica, estrés oxidativo, y radiación), p53 se activa y, mediante una compleja red de mecanismos, puede provocar muerte celular por apoptosis o parada de ciclo celular.

Brevemente los puntos de control y mecanismos por los que p53 regula el ciclo celular son:

Control de fase G1: La diana principal de p53 en esta fase del ciclo celular es  $p21^{Cip1/WAF1}$ , de modo que la activación de p53 aumenta los niveles de ARN mensajero y proteína  $p21^{Cip1/WAF1}$ . La acumulación de esta CKI inhibe la actividad quinasa de varios complejos ciclina-CDK, permitiendo la acumulación de proteína Rb hipofosforilada que provoca la parada del ciclo celular en G1 (Harper et al., 1995). También se ha demostrado el efecto citostático de p53 por mecanismos independientes de  $p21^{Cip1/WAF1}$  (Deng et al., 1995; Michieli et al., 1994). No obstante, cabe destacar que las células carentes de  $p21^{Cip1/WAF1}$  tienen perturbado el control en G1 tras daño en el ADN (Deng et al., 1995).

Control de fase G2/M: p53 puede actuar: a) reprimiendo la transcripción de la ciclina B1 (Agarwal et al., 1995; Stewart et al., 1995), cuya expresión es necesaria para la entrada en fase M (Elledge, 1996; O'Connor, 1997); b) activando la transcripción de GADD45, BTG2 y 14-3-3σ; c) induciendo la muerte celular programada o **apoptosis**. Este tipo de muerte celular se produce de modo natural durante el desarrollo embrionario y postnatal temprano en múltiples tejidos. Su función puede

ser la eliminación de células superfluas en un lugar determinado. Sin embargo, en el organismo adulto la apoptosis se desencadena ante insultos celulares. Cuando el ADN que va a ser o está siendo replicado presenta alteraciones, la apoptosis inducida por p53 u otros mecanismos evita la generación y/o propagación de células con material genético dañado. Existen evidencias que sugieren que la apoptosis podría inducirse por p53 tanto por mecanismos dependientes como independientes de transcripción. La activación transcripcional de bax y Fas/APO1 se ha implicado en la apoptosis inducida por p53 (Miyashita and Reed, 1995; Owen-Schaub et al., 1995). Por ejemplo, bax se transloca a la mitocondria y provoca la liberación de citocromo c y activación de caspasas (Eskes et al., 1998; Goping et al., 1998). Este importante aspecto de la función de p53 se revisa con detalle en (Somasundaram, 2000).

### **Ratón transgénico Súper p53**

El grupo del Dr. Manuel Serrano generó el ratón transgénico Súper p53, el cual presenta una dosis adicional del gen p53 murino (García-Cao et al., 2002). Cabe destacar que el transgen contiene la región promotora de p53, de modo que su regulación es idéntica a la del gen p53 endógeno. Experimentos *in vitro* con MEFs provenientes de ratones con una copia del transgen pero deficientes en p53 endógeno demostraron la funcionalidad del transgen Súper p53, tanto en ensayos de expresión de p21<sup>Cip1/WAF1</sup>, que estaba aumentada, como en respuesta a daño en el ADN y estrés, que provocó una mayor tasa de apoptosis en ratones Súper p53. La funcionalidad del transgen en respuesta a daño en el ADN también fue demostrada *in vivo*. En ambos tipos de experimentos, los parámetros analizados presentaron valores similares a los obtenidos en ratones con un alelo de p53 inactivado.

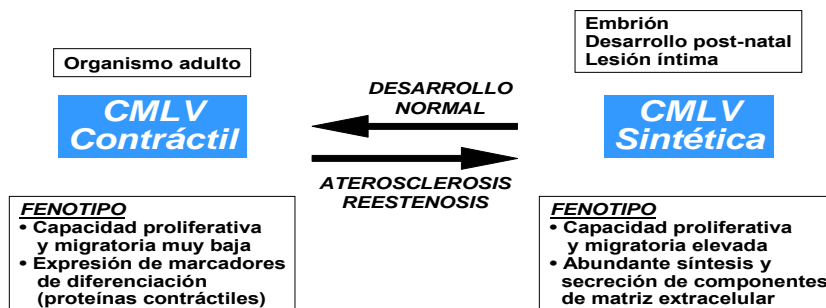
El ratón Súper p53 muestra un desarrollo normal, es fértil, y envejece normalmente. Además, comparado con el ratón silvestre, presenta resistencia a desarrollar tumores, tanto espontáneos como provocados por agentes químicos. También se ha demostrado que la replicación del virus de la estomatitis vesicular está disminuida en MEFs derivados de ratones Súper p53 como consecuencia de un aumento de apoptosis (Muñoz-Fontela et al., 2005).

***Con estos precedentes, el ratón Súper p53 parece un modelo adecuado para estudiar el efecto de aumentar la función de p53 sobre el desarrollo de arteriosclerosis, uno de los objetivos perseguidos en esta Tesis Doctoral.***

## 2. Remodelado vascular patológico: aterosclerosis y lesión vascular inducida por daño mecánico

Aunque el proceso de arteriosclerosis en circunstancias normales puede considerarse un proceso protector en respuesta a daño en el endotelio, cuando la inflamación es persistente se convierte en un proceso nocivo. La arteriosclerosis y enfermedades cardiovasculares asociadas (infarto de miocardio y embolia) son la causa principal de mortalidad y morbilidad en países desarrollados (1996; García Almagro et al., 2001; Murray and Lopez, 1996). El desarrollo de la placa de ateroma es un proceso multifactorial en el que participan de un modo destacado mecanismos inmunes adaptativos e innatos (1996; Fuster et al., 1992; Murray and Lopez, 1996; Ross, 1993). El tipo más común de arteriosclerosis es la **aterosclerosis**, caracterizada por la formación de lesiones con un componente blando lipídico (*athero*) y un componente duro de naturaleza fibrosa o calcificada (*sclerotiv*). Estas lesiones ateroscleróticas, que ocurren principalmente en las arterias elásticas y musculares de calibre grande y medio, provocan la obstrucción progresiva de la luz del vaso afectado y disminuyen su capacidad de vasodilatación. En fases avanzadas del proceso, la rotura de la placa de ateroma puede provocar la formación de trombos y, eventualmente, accidentes isquémicos agudos en corazón, cerebro o extremidades (infarto de miocardio, embolia cerebral, etc).

En la homeostasis, las células de músculo liso vascular (CMLVs) residentes en la capa media de las arterias elásticas presentan un fenotipo diferenciado (contráctil) con tasas de proliferación y migración celular muy bajas. A diferencia del miocito esquelético y cardíaco, una característica del CMLV maduro es que puede sufrir una modulación fenotípica y re-entrar en el ciclo celular en respuesta a varios estímulos fisiológicos y/o patológicos (**figura 5**). Es en este estado activado, el CMLV puede no sólo proliferar, sino también migrar hacia la luz arterial y sintetizar componentes de matriz extracelular y proteasas que modifican la matriz, contribuyendo así a la formación del ateroma (Campbell and Campbell, 1990; Sjolund et al., 1990).



**Figura 5: Modulación fenotípica de las células de músculo liso vascular.** En condiciones de homeostasis, las CMLVs en el individuo adulto se encuentran en un estado diferenciado, quiescente y estático, caracterizado por la expresión abundante de proteínas contráctiles y tasas muy reducidas de proliferación y migración. En respuesta a diversos estímulos aterogénicos, las CMLVs maduras sufren un cambio hacia un fenotipo más sintético caracterizado por una elevada capacidad proliferativa y migratoria y abundante producción de proteínas de matriz extracelular.

## 2.1 Pared vascular y componentes celulares.

En el organismo adulto, la pared de una arteria sana está formada por tres capas. La parte más externa, denominada **adventicia**, es la capa de tejido conectivo formada por abundantes fibras de colágeno, fibras elásticas, numerosos fibroblastos y algunas CMLVs, además de por numerosos vasos (*vasa vasorum*). La parte central, denominada **media**, es una capa muscular formada principalmente por CMLVs y fibras elásticas. La capa más interna, denominada **íntima**, está formada por una monocapa de células endoteliales (CEs). La **lámina elástica interna** separa la íntima y la media, y la **lámina elástica externa** separa la media y la adventicia.

**Células endoteliales.** Entre otras funciones, se encargan de: a) proporcionar una superficie no trombogénica; b) actuar como barrera permeable a través de la cual existe intercambio y transporte activo de sustancias entre la sangre y la pared arterial; c) mantener el tono vascular gracias a la liberación de sustancias que modulan la vasodilatación-vasoconstricción; d) producir y secretar moléculas reguladoras de

crecimiento y citoquinas y componentes de la matriz extracelular, participando en el mantenimiento de la membrana basal; y e) proporcionar una superficie no adherente para los leucocitos.

**Monocitos/Macrófagos.** El papel normal de los macrófagos es actuar no sólo como molécula presentadora de antígenos a los linfocitos T, sino también como células “scavenger” para eliminar materiales nocivos. Además, son fuente de moléculas reguladoras de crecimiento y citoquinas, que en conjunto contribuyen al proceso fibroproliferativo característico de la arteriosclerosis. Los macrófagos se convierten en células “espumosas” cuando internalizan lipoproteínas modificadas por acción de los receptores “scavenger” CD36 y SR-A, además de oxidarlas ellos mismos a través de diferentes rutas. El macrófago está presente en todos los estadios de la lesión ateromatosa. (Gown et al., 1986; Jonasson et al., 1986; Ross, 1986).

**Linfocitos T.** También presentes en el ateroma. Aunque en menor medida que los macrófagos y CMLVs, parecen estar relacionados con la presentación antigénica a los macrófagos de la placa, con la consiguiente liberación de sustancias como lipoproteínas de baja densidad oxidadas.

**Células de músculo liso vascular.** Durante el desarrollo embrionario se originan a partir del mesodermo o de la cresta neural (Schwartz et al., 1990). Se ha demostrado que las CMLVs de arterias con diferente origen embrionario pueden responder de modo diferente a los efectores con los cuales tienen contacto, lo que contribuiría a la diferente susceptibilidad a desarrollar ateroma observada en los diferentes lechos vasculares (Castro et al., 2003; Hultg rh-Nilsson et al., 1991). La capacidad de contracción-relajación del CMLV en respuesta a vasomoduladores (vasoconstrictores y vasorelajadores) juega un papel fundamental en el mantenimiento del tono vascular. De hecho, entre las alteraciones del CMLV durante la arteriosclerosis destaca su alterada respuesta a vasomoduladores. Además, como se ha indicado anteriormente, un factor clave en el crecimiento del ateroma es la excesiva respuesta proliferativa y migratoria del CMLV. Al igual que el macrófago, el CMLV de la lesión ateromatosa se convierte en célula “espumosa” al captar lípidos presentes en la matriz extracelular. Numerosos trabajos demuestran que en el proceso aterogénico se produce el cambio del CMLV desde el estado contráctil al fenotipo sintético (**figura 5**).

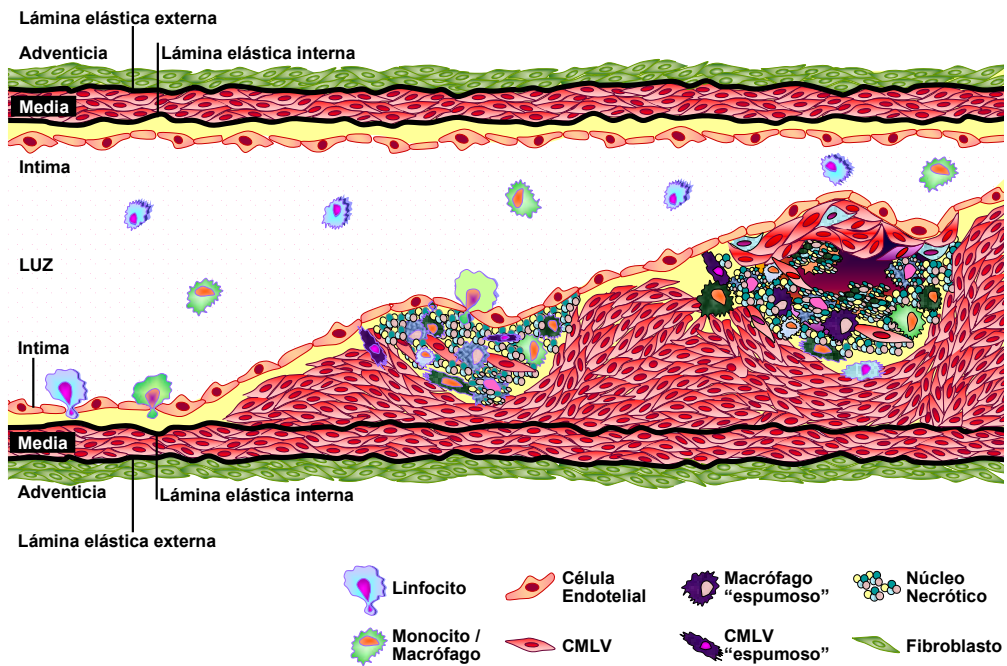
**Plaquetas.** Se adhieren al endotelio dañado y, tras su agregación y activación, liberan una gran cantidad de sustancias que aumentan la adhesión de monocitos y la proliferación y migración de las CMLVs.

Tras la ruptura de la placa, las plaquetas son las responsables de la formación del trombo.

## 2.2 Progresión de la placa de ateroma

Desde que en el año 1973 Ross propusiera la hipótesis de la **“respuesta a daño arterial”**, muchos han sido los estudios realizados con el fin de llegar a comprender el mecanismo por el que una lesión ateromatosa se inicia y progresa. Hoy en día se acepta la hipótesis de la **disfunción endotelial**, propuesta también por Ross en 1993 y que supone que la aterosclerosis es iniciada por un sutil daño en las CEs en respuesta a diversos **factores de riesgo cardiovascular**, como por ejemplo hipercolesterolemia, hipertensión, tabaquismo, niveles elevados de homocisteína, inactividad física, estrés, edad, sexo (mayor incidencia en varones comparado con mujeres premenopáusicas) y factores genéticos (Ross, 1993; Ross, 1999).

En la **figura 6** se muestra un esquema que reproduce la progresión de la placa de ateroma. La disfunción endotelial provoca el incremento en la adhesión de monocitos/macrófagos y linfocitos T, que migran a través del endotelio y liberan una plétora de citoquinas y quimioquinas que estimulan tanto la de-diferenciación como la proliferación de las CMLVs. Además, el CMLV activado migra desde la media hacia la luz del vaso, donde sintetiza componentes de matriz extracelular y proteasas capaces de disminuir la estabilidad de la placa ateromatosa (Ross, 1999). De modo que el crecimiento y respuesta sintética de las CMLVs y macrófagos y la acumulación de lípidos y componentes de matriz extracelular contribuye al desarrollo del ateroma y la subsiguiente oclusión progresiva del vaso afectado. Cuando se produce la rotura de la placa y entran en contacto los componentes del centro ateromatoso con las sangre, se estimula la adhesión y agregación plaquetaria, formándose un trombo que puede ocluir por completo la luz. Una **placa vulnerable** a la ruptura se caracteriza por presentar una gran cantidad de lípidos, cubiertos de una cubierta fibrosa delgada, con poco colágeno y con alto componente inflamatorio (Mann and Davies, 1996).



**Figura 6: Desarrollo de la lesión ateromatosa.** En la parte izquierda de la figura se representa las tres capas de una arteria sana (adventicia, media e íntima, separadas por la lámina elástica externa e interna). Cuando acontecen estímulos aterogénicos (hipercolesterolemia, hipertensión, diabetes, etc.) se desencadena la disfunción endotelial, que conduce a una adhesión y activación leucocitaria. Los leucocitos que se acumulan en la neointima liberan citoquinas que estimulan la entrada de monocitos y su posterior transformación a macrófagos, que liberan más citoquinas y quemoquinas. Estas sustancias promueven la proliferación celular y la captación de lípidos, formándose las células espumosas que constituyen la estría grasa (ateroma temprano). Conforme esta lesión inicial va progresando se convierte en lesión intermedia, en la que las CMLVs procedentes de la media se acumulan, proliferan y captan lípidos, formando nuevas células espumosas que sintetizan proteínas de matriz extracelular. Posteriormente se forman las lesiones fibrosas, con núcleos necróticos rodeados de una cubierta fibrosa. La síntesis y degradación de proteínas de matriz, así como el espesor de la capa fibrosa son aspectos clave en la regulación de la estabilidad de las lesiones. En caso de ser poco fibrosas y con pocas CMLVs, el ateroma es altamente vulnerable a la rotura.

## 2.3 El ratón deficiente en apolipoproteína E como modelo experimental de aterosclerosis

El ratón silvestre es muy resistente a desarrollar arteriosclerosis, incluso cuando se le somete durante tiempo prolongado a dietas con un elevado contenido en colesterol y grasas. Sin embargo, existen diversos modelos de ratones modificados genéticamente que presentan alta susceptibilidad a desarrollar arteriosclerosis, como por ejemplo el ratón deficiente en el receptor de las lipoproteínas de baja densidad (RLDL-KO), deficiente en apolipoproteína E (apoE-KO), y los ratones transgénicos para la apolipoproteína E3 humana (apoE3\*Leiden) o para la apolipoproteína B humana (apoB). Por ser el ratón apoE-KO el modelo experimental empleado en diversos estudios de esta Tesis Doctoral, se describen a continuación sus características principales.

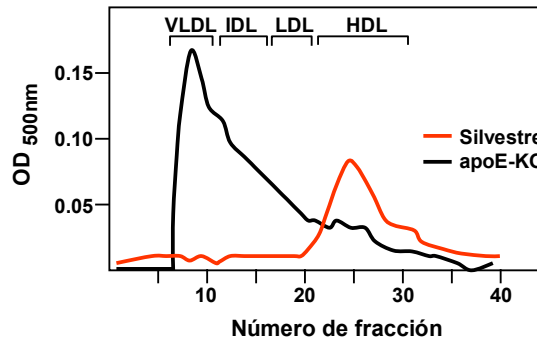
La apoE es una glicoproteína de aproximadamente 34 Kd sintetizada mayoritariamente en el hígado, tanto en humanos como en ratones, aunque también se expresa en macrófagos y cerebro. Es un componente estructural de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) sintetizadas por el hígado, y de una subclase de lipoproteínas de alta densidad (HDL) implicadas en el transporte del colesterol entre células (Mahley, 1986). La apoE media la unión de alta afinidad de las lipoproteínas que la contienen con el RLDL, siendo pues la responsable de la captación celular de esas partículas (Hui et al., 1981). La apoE también forma parte de los quilomicrones remanentes sintetizados por el intestino (Driscoll and Getz, 1984). Además, se ha descrito que la apoE es un ligando de receptores relacionados con lipoproteínas de baja densidad (LDL), como el LRP (LDL-related protein) (Mahley and Ji, 1999), donde apoE juega un papel importante en la unión tanto a la superficie de lipoproteínas como en la unión a proteoglicanos heparan sulfato. Entre sus funciones también se ha observado un papel antioxidante (Miyata and Smith, 1996), anti proliferativo (Ishigami et al., 1998), en la agregación plaquetaria (Riddell et al., 1997) y propiedades inmunomoduladoras (Zhou et al., 1998).

El ratón apoE-KO fue creado independientemente en 1992 por dos laboratorios (Piedrahita et al., 1992; Plump et al., 1992). Son ratones viables, fértiles y de tamaño similar a los silvestres. Las diferencias principales estriban en el **perfil lipídico y lipoproteico**, como se muestra en la **figura 7**. Así, el perfil lipoproteico de los ratones silvestres se caracteriza por niveles elevados de colesterol en forma de HDL, mientras que las lipoproteínas con tamaño correspondiente a muy baja densidad, baja o intermedia (VLDL, LDL e IDL respectivamente) se encuentran en niveles de trazas. Por el contrario, los ratones apoE-KO presentan una reducción muy significativa en los niveles de HDL y un aumento de los niveles de colesterol asociado a la fracción VLDL. Los



niveles de triglicéridos, aunque estadísticamente elevados en ausencia de apoE, pueden considerarse próximos a los normales.

| Genotipo      | Colesterol total (mg/dl) | Colesterol en HDL (mg/dl) | Triglicéridos (mg/dl) |
|---------------|--------------------------|---------------------------|-----------------------|
| Silvestre     | 86 ± 20                  | 73 ± 28                   | 73 ± 36               |
| Heterocigotos | 88 ± 22                  | 75 ± 18                   | 102 ± 40              |
| Deficiente    | 434 ± 129                | 33 ± 15                   | 123 ± 51              |



**Figura 7: Perfil lipídico y lipoproteico del ratón deficiente en apolipoproteína E.** En la tabla se representan los niveles de colesterol, el contenido de colesterol en las HDLs y el nivel de triglicéridos en plasma para los tres genotipos en estudio (silvestre, heterocigoto y deficiente en apoE) (media ± desviación estándar). En la gráfica se muestra el contenido de colesterol en las distintas fracciones lipoproteicas obtenidas por cromatografía para ratones silvestres y apoE-KO. Básicamente la deficiencia en apoE produce un cambio pro-aterogénico en el perfil lipídico y lipoproteico, permitiendo el desarrollo de lesiones ateromatosas, incluso de modo espontáneo, con un fenotipo similar al de la lesiones desarrolladas por humanos. Datos obtenidos por Zhang y colaboradores (Zhang et al., 1992).

Además, el fenotipo de estos ratones es muy parecido al de los humanos con alteraciones en este gen, presentando hipercolesterolemia, niveles de triglicéridos similares a los niveles normales, disminución de HDL, acumulación de VLDL y LDL, y acumulación de apoB. Por todo ello constituyen un **modelo experimental** muy adecuado para el estudio de la **aterosclerosis**. Del mismo modo, la progresión y la histopatología de las lesiones de los ratones deficientes en apoE presentan características similares a las observadas en humanos, incluyendo la presencia de estrías grasas, núcleos necróticos y cubiertas fibrosas (Nakashima et al., 1994; Plump et al., 1992; Reddick et al., 1994; van Ree et al., 1994; Zhang et al., 1994; Zhang et al., 1992). Recientemente se ha demostrado la presencia de lesiones en la arteria braquioencefálica con características similares a las placas vulnerables de los humanos, incluyendo la formación de un núcleo necrótico, erosión de la masas

necrótica a través de la luz arterial y hemorragia intraplaca (Rosenfeld et al., 2000).

El ratón apoE-KO desarrolla espontáneamente lesiones ateroscleróticas cuando se mantiene en dieta control, y este proceso se acelera al someterlo a dietas ricas en grasa, especialmente si contienen colato sódico (Nishina et al., 1990). Las primeras lesiones observadas en un ratón apoE-KO joven alimentado con dieta control se localizan en la aorta proximal y están formadas principalmente por monocitos. A las 10 semanas de edad, las lesiones están formadas por células “espumosas” y a partir de las 15 semanas de edad encontramos ya las lesiones intermedias, que se convierten en avanzadas cuando los ratones cumplen las 20 semanas de edad. En presencia de una dieta tipo Western (por ejemplo, con un contenido de colesterol del 0,15%) la aparición y desarrollo del ateroma se acelera, y la localización varía, apareciendo lesiones tras 10 semanas en las ramificaciones de la arteria mesentérica superior, en las arterias renales y en la bifurcación de la arteria pulmonar. El tipo de lesión observada a tiempos largos en ambas dietas es similar (Sehayek et al., 2000). Sin embargo, los ratones heterocigotos con un solo alelo de apoE inactivado necesitan una dieta rica en grasa y colesterol para desarrollar placas de ateroma (van Ree et al., 1994; Zhang et al., 1994).

## 2.4 Lesión mecánica de la pared vascular

La angioplastia percutánea transluminal coronaria (APTC) es una técnica de revascularización ampliamente empleadas desde 1977 para el tratamiento de pacientes con enfermedad coronaria severa (Gruentzig, 1984). El proceso consiste en hacer pasar por el interior de la arteria ocluida un catéter con un extremo hinchable, con lo que se consigue la dilatación de la pared arterial, restableciéndose el flujo sanguíneo. Sin embargo, un 30-40% de pacientes sufre, normalmente dentro de los tres-doce primeros meses tras la intervención, un proceso de reoclusión del vaso denominado **reestenosis** (Mabin et al., 1985; Phillips-Hughes and Kandarpa, 1996; Roubin et al., 1988). Actualmente se utilizan dispositivos que reducen significativamente las tasas de reestenosis, como son los stent coronarios, con los que la reestenosis es de 10-20% en los primeros 6 meses tras la intervención.

Se acepta que la reestenosis es un proceso inflamatorio vascular similar a la aterosclerosis, que se origina por la lesión mecánica de la monocapa endotelial. Este fenómeno aparece como consecuencia de la activación, de-diferenciación, proliferación y migración de las CMLVs

desde la media hacia la luz del vaso. Utilizando modelos animales se han realizado numerosos estudios sobre los procesos moleculares y celulares que ocurren en respuesta al daño mecánico arterial provocado tras una angioplastia. Se acepta que hay una fase inicial de proliferación y migración de las CMLVs que conduce al engrosamiento de la neoíntima durante las primeras semanas, seguida del restablecimiento del fenotipo quiescente en un plazo de tiempo variable dependiendo del modelo, típicamente de 2 a 4 semanas (Geary et al., 1996; Groves et al., 1995; Kohchi et al., 1987; Reis et al., 2000; Roqué et al., 2000). Las lesiones desarrolladas tras denudación en ratones apoE-KO alimentados con una dieta control están formadas fundamentalmente por CMLVs (Zhu et al., 2000), mientras que en ratones alimentados con una dieta grasa se observa además la formación de células espumosas y cristales de colesterol (Weingärtner et al., 2005).

## **2.5 Importancia de la proliferación en el desarrollo de la neointima**

Aunque varios estudios en conejos hiperlipidémicos han demostrado una correlación inversa entre el tamaño de la lesión ateromatosa y el índice de proliferación arterial (McMillan and Stary, 1968; Rosenfeld and Ross, 1990; Spraragen et al., 1962a; Spraragen et al., 1962b), se ha observado que existe proliferación celular en la pared arterial en todas las fases de desarrollo del ateroma (Cortés et al., 2002; Díez-Juan and Andrés, 2001; Ross, 1993). Tal y como se ha detallado con anterioridad, las CMLVs juegan un papel importante y crítico en la patogénesis de desordenes proliferativos cardiovasculares como la aterosclerosis, la reestenosis post-angioplastia, la arteriosclerosis por transplante y la vasculopatía cardiaca. Se acepta que esta respuesta hiperproliferativa en la pared arterial ocurre fundamentalmente durante las fases iniciales del proceso aterogénico.

Así, la **expresión de marcadores de proliferación** se ha documentado en placas ateromatosas humanas y lesiones reestenóticas (Burrig, 1991; Essed et al., 1983; Gordon et al., 1990; Katsuda et al., 1993; Kearney et al., 1997; Nobuyoshi et al., 1991; O'Brien et al., 1993; Orekhov et al., 1998; Rekhter and Gordon, 1995; Tanner et al., 1998; Veinot et al., 1998; Wei et al., 1997). Sin embargo, existe controversia en la magnitud de la respuesta hiperplástica, habiéndose descrito tanto índices de proliferación muy bajos (Gordon et al., 1990; Katsuda et al., 1993; O'Brien et al., 1993; Rekhter and Gordon, 1995; Veinot et al., 1998) como elevadas tasas proliferativas (Essed et al., 1983; Kearney et al., 1997; Nobuyoshi et al., 1991; Pickering et al., 1993). Esta variabilidad puede explicarse por las diferentes arterias analizadas en los diferentes

estudios (arterias periféricas, coronarias y carótidas), variabilidad en el estadio de aterosclerosis en el momento de analizar las muestras, y aspectos metodológicos.

Los tipos celulares que proliferan en el tejido aterosclerótico son las CMLVs, los leucocitos y las CEs (Burrig, 1991; Gordon et al., 1990; Katsuda et al., 1993; O'Brien et al., 1993; Orekhov et al., 1998; Rekhter and Gordon, 1995; Veinot et al., 1998). Análisis histológicos de 20 pacientes sometidos a APTC revelaron que la extensión de marcadores de proliferación en la lesión era significativamente mayor en tejido con evidencias de tener roturas en la media o adventicia comparado con lesiones sin ninguna rotura o sólo presente en la íntima (Nobuyoshi et al., 1991). Además, en las lesiones examinadas dentro de los 6 meses tras la angioplastia, las CMLVs proliferantes presentaban el fenotipo sintético, y se observaba abundante contenido de matriz extracelular compuesta por proteoglicanos. Cuando se examinaron lesiones entre los 6 meses y los dos años después de realizar la APTC, el fenotipo de las CMLVs había regresado al estado contráctil, y la matriz extracelular estaba compuesta sobre todo por colágeno. Después de dos años tras la revascularización, las lesiones eran prácticamente indistinguibles de las lesiones ateromatosas.

Además, también se observó mayor actividad proliferativa en tejido aterosclerótico primario comparado con la zona de la media en muestras de arteria carótida de pacientes sometidos a endarterectomía quirúrgica (Rekhter and Gordon, 1995). En la íntima de estas lesiones, el 46% de las células proliferantes fueron monocitos/macrófagos, frente a un 10% de CMLVs, 14% de CEs y 13% de linfocitos T. Por el contrario, el tipo celular proliferante mayoritario en la media fue la CMLV (44%), seguido de CE (20%), linfocitos T (14%) y monocitos/macrófagos (13%).

También es importante reseñar que la proliferación celular en arterias periféricas humanas y arterias coronarias es mayor en lesiones reestenóticas que en lesiones ateromatosas primarias (O'Brien et al., 1993; Pickering et al., 1993). Además, la capacidad proliferativa de cultivos de CMLVs obtenidas de lesiones estenóticas avanzadas es menor que la de CMLVs obtenidas de lesiones reestenóticas recientes (Dartsch et al., 1990).

Podemos pues concluir que, tanto en humanos como en modelos animales, la **proliferación celular** en la pared arterial ocurre **predominantemente al principio** de la formación de lesiones ateromatosas y reestenóticas, **declinando progresivamente**. Es pues de gran importancia conocer los **mecanismos que controlan la hiperplasia de la lesión neoíntima**. Dada la complejidad del tema, nos

centraremos únicamente en discutir el papel que juegan **p27<sup>Kip1</sup>** y **p53** en este proceso, por ser estas proteínas el objetivo principal de buena parte de los estudios presentados en esta Tesis Doctoral (**trabajo 3 y 4**, respectivamente).

### 2.5.1 Papel de p27<sup>Kip1</sup> en la hiperplasia de la neoíntima

Varios estudios han implicado a la proteína p27<sup>Kip1</sup> en el control del crecimiento de las CMLVs. Por ejemplo, la regulación de la respuesta fenotípica de las CMLVs a factores mitogénicos está regulada por p27<sup>Kip1</sup>, determinando cuando las células crecen de un modo hipertrófico o hiperplásico (Braun-Dullaes et al., 1999; Servant et al., 2000). Además, se ha demostrado que las CMLVs usan mecanismos transcripcionales y post-traduccionales para regular p27<sup>Kip1</sup>, dependiendo de los estímulos a los que se encuentran expuestas (Sedding et al., 2003).

La **tabla 1** resume los trabajos que han estudiado el papel de p27<sup>Kip1</sup> en el control de la hiperplasia de la neoíntima utilizando modelos animales de aterosclerosis inducida por dieta y denudación mecánica.

#### p27<sup>Kip1</sup> y reestenosis

En 1997 nuestro grupo demostró que la unión de p27<sup>Kip1</sup> a CDK2 en cultivos de CMLVs crecidas en ausencia de suero provocaba una disminución de su actividad quinasa (Chen et al., 1997). La sobreexpresión de p27<sup>Kip1</sup> mediante vectores adenovirales reproducía este efecto, que se acompañaba de la represión del promotor de ciclina A. En un modelo *in vivo* de engrosamiento de la neoíntima tras angioplastia por balón en arteria carótida de rata se observó un aumento progresivo en los niveles de p27<sup>Kip1</sup>, cuyo nivel máximo coincidía con una disminución de la actividad CDK2 y el reestablecimiento del fenotipo quiescente en la pared arterial. Por otro lado, la sobreexpresión de p27<sup>Kip1</sup> en las arterias lesionadas reducía la formación de la neoíntima. Trabajos posteriores de nuestro laboratorio han demostrado que la inducción del factor de transcripción Sp1 contribuye a la inducción de p27<sup>Kip1</sup> a tiempos tardíos post-angioplastia (Andrés et al., 2001).

Estudios posteriores de otros grupos en arterias de conejo y cerdo sometidas a angioplastia han corroborado la eficacia terapéutica de la sobreexpresión de p27<sup>Kip1</sup> (Tanner et al., 2000) y de la proteína quimérica p27/p16 (McArthur et al., 2001; Tsui et al., 2001). Sin embargo, existe controversia respecto al efecto de inactivar p27<sup>Kip1</sup> sobre el desarrollo de la lesión neoíntima inducida por daño mecánico. Por un lado, Roqué y colaboradores no observaron diferencias en la cantidad de

lesión en arteria femoral comparando ratones silvestres y deficientes en p27<sup>Kip1</sup> (Roqué et al., 2001). Por el contrario, Boehm y colaboradores observaron un aceleramiento en la formación de la neointima en ratones deficientes de p27<sup>Kip1</sup> (Boehm et al., 2004). Una posible explicación a esta discrepancia podría ser la distinta cepa de los ratones analizados, un fondo mixto C57BL/6-SV129 frente a uno puro C57BL/6, respectivamente.

Recientemente se ha relacionado de un modo indirecto la inhibición de la neointima con elevados niveles de p27<sup>Kip1</sup>. Se sabe que los factores de transcripción FORKHEAD pertenecientes a la subfamilia FOXO inhiben el crecimiento y la progresión del ciclo celular en una gran variedad de células. Cuando en un modelo de angioplastia por balón en la arteria carótida de rata se transfectaron las CMLVs con adenovirus portando un factor FORKHEAD constitutivamente activo (el mutante resistente a fosforilación TM-FKHRL1), se observó un incremento en los niveles de p27<sup>Kip1</sup> que se correlacionó con menor hiperplasia de la neointima. Este resultado sugiere la posibilidad de utilizar esta cascada de señalización como diana terapéutica para estas vasculopatías (Abid et al., 2005).

| Modelo de Enfermedad Vascular               | Manipulación Genética   | Efecto sobre la lesión  | Referencia                         |
|---|---|---|------------------------------------|
| Angioplastia (rata, cerdo)                  | Sobreexpresión arterial de p27 <sup>Kip1</sup> con adenovirus   | Reducción   | Tanner, 2000<br>Chen, 1997         |
| Angioplastia (conejo, cerdo)                | Sobreexpresión de la quimera w9 (p27/p16)   | Reducción   | McArthur, 2000<br>Tsui, 2001       |
| Denudación endotelial (ratón C57BL/6/SV129) | Inactivación global de p27 <sup>Kip1</sup>  | Sin efecto  | Roqué, 2001                        |
| Denudación endotelial (ratón C57BL/6)       | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Inactivación global de p27<sup>Kip1</sup></li> <li>• Transplante de médula ósea de ratones deficientes en p27<sup>Kip1</sup> en arterias de ratones silvestres lesionadas mecánicamente</li> </ul> | Aumento (infiltración de células inmunes e inflamatorias)   | Boehm, 2004                        |
| Aterosclerosis (ratón apoE-KO)              | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Inactivación global de p27<sup>Kip1</sup> (de 1 o 2 alelos)</li> <li>• Transplante de médula ósea de ratones doble deficientes p27<sup>Kip1</sup>-apoE en ratón apoE-KO irradiado</li> </ul>       | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Aumento dependiente de dosis</li> <li>• Aumento</li> </ul> | Díez-Juan, 2001<br>Díez-Juan, 2004 |

Tabla 1. Efectos de la manipulación de la expresión de p27<sup>Kip1</sup> sobre el desarrollo de lesiones vasculares obstructivas en modelos experimentales de denudación endotelial (daño mecánico) y aterosclerosis.

p27<sup>Kip1</sup> y aterosclerosis

Tanner y colaboradores (Tanner et al., 1998) describieron que p27<sup>Kip1</sup> se expresaba preferentemente en células no proliferantes de ateroma humano, sugiriendo una relación inversa entre los niveles de p27<sup>Kip1</sup> y la tasa de proliferación en la placa de ateroma. Otros autores demostraron co-localización de TGFβ y p27<sup>Kip1</sup> en lesiones de ateroma humanas, sugiriendo que el efecto antimitogénico de TGFβ en la placa podría estar mediado por p27<sup>Kip1</sup> (Ihling et al., 1999). Posteriormente, nuestro grupo demostró una relación causa-efecto entre ausencia de p27<sup>Kip1</sup> y aceleramiento de aterosclerosis, puesto que ratones doblemente deficientes para p27<sup>Kip1</sup> y apoE sometidos a dieta rica en grasa y colesterol presentaban una exacerbación de la lesión ateromatosa al compararlos con ratones silvestres para p27<sup>Kip1</sup> pero deficientes en apoE, a pesar de mostrar una hipercolesterolemia comparable (Díez-Juan and Andrés, 2001). Este incremento de la lesión se acompañó de un aumento en la tasa de proliferación de macrófagos y CMLVs. En este trabajo se comprobó que la ausencia de p27<sup>Kip1</sup> *per se* no es aterogénica, pues ratones deficientes en esta CKI con una dotación normal de apoE, los cuales no mostraron hipercolesterolemia, no desarrollaron ateromas a pesar de su alimentación con una dieta rica en grasa, colesterol y colato sódico. Otro hecho remarcable fue que el incremento de lesión fue dosis dependiente de la cantidad de p27<sup>Kip1</sup>, de modo que en ratones apoE-KO el fenotipo fue más acusado en ausencia total de p27<sup>Kip1</sup> comparado con ratones con un único alelo de p27<sup>Kip1</sup> inactivado (Díez-Juan and Andrés, 2001).

En un trabajo posterior nuestro grupo empleó una estrategia de trasplante de médula ósea (TMO) procedente de ratones deficientes en apoE o dobles deficientes en p27<sup>Kip1</sup> y apoE para estudiar el efecto de la ausencia de p27<sup>Kip1</sup> de un modo selectivo en los macrófagos (Díez-Juan et al., 2004). Los ratones apoE-KO irradiados sub-letalmente que recibieron médula ósea doblemente deficiente p27<sup>Kip1</sup>-apoE mostraron un incremento en la proliferación de los macrófagos del ateroma y de la producción de las citoquinas inflamatorias CCL2/MCP-1 (proteína quimiotrayente de monocitos) y de CCL5/RANTES, que se correlacionó con la formación de lesiones ateromatosas de mayor tamaño.

La existencia de diferentes linajes sugiere que las CMLVs en las diferentes zonas del árbol aórtico puedan responder diferencialmente frente a estímulos aterogénicos. De hecho, está bien establecido que existen diferencias en la susceptibilidad a desarrollar arteriosclerosis en diversos lechos vasculares (Chamley-Campbell et al., 1981; Hao et al., 2003; Li et al., 2001; Majack et al., 1996; Olson et al., 2000; Yang et al., 1998). Diversos estudios sugieren que estas diferencias están relacionadas

con los niveles intrínsecos de p27<sup>Kip1</sup>. Así, la mayor respuesta proliferativa de CMLVs humanas derivadas de vena safena comparada con arteria mamaria se correlacionan con menor capacidad de disminuir los niveles de p27<sup>Kip1</sup> en respuesta a PDGF-BB (Yang et al., 1998). Además, nuestro grupo ha demostrado una distinta regulación de la cascada de señalización de la quinasa activada por mitógeno (MAPK) y de p27<sup>Kip1</sup> en CMLVs de diferentes lechos vasculares de conejo, sugiriendo un papel de p27<sup>Kip1</sup> en el establecimiento de la variabilidad fenotípica regional (Castro et al., 2003). Así, las CMLVs aisladas del cayado aórtico (ACMLVs) tienen mayor actividad proliferativa y migratoria que las CMLVs aisladas de arteria femoral (FCMLVs). En concordancia, las ACMLVs presentan niveles de p27<sup>Kip1</sup> más bajos, debido probablemente a una mayor cantidad de fosforilación en T187 y ubiquitinización de la proteína, y la sobreexpresión de p27<sup>Kip1</sup> en estas células reduce su tasa de proliferación y migración. Las diferencias en la expresión de p27<sup>Kip1</sup> en ACMLVs y FCMLVs se explican debido a una regulación diferencial de la quinasa regulada por señales extracelulares (ERKs), cuya activación por PDGF-BB es mayor en las ACMLVs. Además, la inhibición de ERKs con inhibidores específicos de MAPK, como PD98059, incrementa los niveles de p27<sup>Kip1</sup> e inhibe la proliferación y la migración de ACMLVs. Por el contrario, al forzar en las FCMLVs la actividad ERK mediante la sobreexpresión de un mutante constitutivamente activo (MEKE), los niveles de p27<sup>Kip1</sup> disminuyeron y se observó un aumento significativo de proliferación y migración celular.

### **2.5.2 Papel de p53 en la hiperplasia de la neoíntima**

Una de las primeras observaciones *in vivo* que sugirieron un papel de p53 en el control del desarrollo de la lesión neoíntima data de 1994, al observarse que el 38% de las lesiones reestenóticas humanas de pacientes sometidos a angioplastia presentaban niveles elevados de p53, que además correlacionaron con la presencia de citomegalovirus humano (Speir et al., 1994). Los autores demostraron *in vitro* como la unión de IE84, una de las proteínas de citomegalovirus humano, era la responsable de la inhibición de la función de p53. Estos resultados sugirieron que la infección por citomegalovirus puede aumentar el riesgo de reestenosis debido a una mayor respuesta proliferativa causada por la inactivación de p53. Iacopetta y colaboradores demostraron que p53 se encontraba sobreexpresado, pero no mutado, en el 61% de las muestras de tejido aterosclerótico humano analizado (Iacopetta et al., 1995). Además, la sobreexpresión con adenovirus de p53 en CMLVs de aorta de humanos condujo a un aumento de los niveles de p21<sup>Cip1/WAF1</sup>, que se



tradujo en una parada del ciclo celular en la fase G1, además de una acumulación de células apoptóticas (Katayose et al., 1995).

Posteriormente se sugirió que la activación transcripcional de p21<sup>Cip1/WAF1</sup> por p53 es un mecanismo protector frente al crecimiento de ateroma, puesto que en lesiones arterioscleróticas humanas avanzadas se comprobó que las células vasculares (CMLVs, macrófagos y CEs) que carecían de marcaje positivo para marcadores proliferativos expresaban p53 y p21<sup>Cip1/WAF1</sup> (Ihling et al., 1997). Además, se ha demostrado que existe co-localización de MDM2 y p53 tanto en macrófagos como en CMLVs. Dado que MDM2 es una proteína que regula negativamente los efectos de p53 en el ciclo celular, se ha sugerido que la célula prolifera o sufre apoptosis en función de la abundancia de cada una de estas proteínas (proliferación cuando predomina MDM2 y apoptosis cuando hay mayor cantidad de p53) (Ihling et al., 1998).

Al igual que ocurría con p27<sup>Kip1</sup>, los niveles de expresión de p53 son distintos en función del estado y procedencia de las células. El grupo de la doctora Badimon demostró que la proliferación y migración de las CMLVs de explantes arteriales porcinos inducida por mitógenos estaba precedida de la disminución de los niveles de p53, cuya expresión aumentaba en ausencia de suero (Rodríguez-Campos et al., 2001). También los niveles de p53 varían en CMLVs humanas en función de si proceden de arterias sanas o reestenóticas (r-CMLVs). Tras daño en el ADN, ambas células incrementan los niveles de p53, pero sólo las r-CMLVs eran capaces de parar el ciclo celular e inducir apoptosis, presentando pues una mayor respuesta a p53 (Scott et al., 2002).

La inactivación de p53 en CMLVs, lograda mediante transfección de oligodeoxinucleótidos antisentido, se tradujo en un aumento en la proliferación celular, (Aoki et al., 1999; Matsushita et al., 2000) mientras que la sobreexpresión de p53 mostró el efecto contrario (Yonemitsu et al., 1998). El análisis *ex vivo* de cultivos de órganos demostró que la sobreexpresión de p53 en vena safena humana inhibía la formación de la neoíntima a los 14 días, efecto que se asociaba con una reducción de la migración de las CMLVs y un aumento de apoptosis. Sin embargo, el efecto de la sobreexpresión de p53 sobre la proliferación celular en la neoíntima fue bifásico, con actividad reducida a los 4 días después de la transfección pero no hubo diferencias a los 14 días. Sin embargo, la proliferación en la media no se vió afectada en ningún tiempo estudiado tras la infección con p53 (George et al., 2001).

A continuación se resumen los diferentes modelos experimentales de aterosclerosis, denudación mecánica y arteriosclerosis por trasplante en los que se ha examinado el papel de p53 sobre el desarrollo de la

neointima utilizando estrategias de terapia génica y ratones modificados genéticamente (**ver Tabla 2**).

### **p53 y aterosclerosis:**

La primera demostración de una relación causa-efecto entre aterosclerosis y p53 se debe a Guevara y colaboradores, quienes demostraron en 1999 que ratones doblemente deficientes en p53 y apoE alimentados con dieta rica en grasa y colesterol desarrollaban más aterosclerosis que ratones apoE-KO con dotación normal de p53, sin mostrar diferencias en la hipercolesterolemia al comparar ambos grupos de ratones (Guevara et al., 1999). Estudios inmunohistoquímicos en tejido ateromatoso mostraron que el agravamiento del proceso aterogénico en ratones doblemente deficientes p53-apoE se correlacionaba con un aumento del 280% en la proliferación celular (principalmente macrófagos) y un incremento del 180% en la apoptosis (aunque sólo las diferencias en proliferación fueron estadísticamente significativas). Recientemente, utilizando también ratones doblemente deficientes p53-apoE, el grupo del Dr. Bennett ha corroborado un incremento significativo de la lesión en la aorta, aunque no observaron diferencias en la arteria braquioencefálica (Mercer et al., 2005). También coincidieron en observar mayor proliferación celular en las lesiones de ratones doblemente deficientes p53-apoE, pero sus estudios revelaron una disminución de la apoptosis, a diferencia del trabajo de Guevara y colaboradores (Guevara et al., 1999).

Existen más evidencias que demuestran el papel ateroprotector de p53. Primero, ratones apoE-3\*Leiden transplantados con médula ósea de ratones deficientes en p53 presentaron lesiones de mayor tamaño (2,3 veces), más fibrosas, con mayor necrosis (5 veces) y más depósitos de colesterol que los transplantados con médula ósea de ratones silvestres (van Vlijmen et al., 2001). La deficiencia de p53 en los macrófagos no alteró de un modo estadísticamente significativo ni la proliferación ni la apoptosis, si bien en el caso de la apoptosis se observó una tendencia a la baja que indujo a los autores a pensar que la menor apoptosis sería el mecanismo que contribuiría al incremento de lesión observada en ausencia de p53 en los macrófagos. En un segundo trabajo, los ratones deficientes en RLDL transplantados con médula ósea proveniente de ratones deficientes en p53 presentaron un incremento de 330% en la proliferación de células del ateroma (siendo también los macrófagos las células más proliferantes) y lesiones ateromatosas de mayor tamaño (Merched et al., 2003). Tampoco hubo efecto en la apoptosis de las células de la lesión. En ambos estudios se observó una disminución en el contenido de fibras de colágeno en ratones transplantados con médula

ósea carente de p53, sugiriendo que p53 es un factor que contribuye a la estabilización del ateroma (Merched et al., 2003; van Vlijmen et al., 2001).

Recientemente, el grupo del Dr. Bennett ha realizado experimentos de TMO en los que los ratones receptores del trasplante eran doblemente deficientes para apoE y p53 (Mercer et al., 2005). No observaron diferencias en la lesión desarrollada en la arteria braquioencefálica de ratones que recibieron TMO silvestre y deficiente para p53. Sin embargo, la arteriosclerosis en la aorta fue menor en los ratones transplantados con p53 silvestre. El análisis de las lesiones mostró una reducción de la proliferación celular, apoptosis y de la relación cubiertas fibrosas enterradas/multicapas en aquellas lesiones procedentes de ratones transplantados con médula ósea silvestre para p53. Además, estos autores demostraron que p53 protege frente a apoptosis en CMLVs y células estromales derivadas de médula ósea, mientras que inducía apoptosis en macrófagos. También observaron que p53 reducía la transdiferenciación de las células estromales derivadas de médula ósea a CMLVs sin afectar a la formación de células espumosas.

| Modelo de Enfermedad Vasculare   | Manipulación Genética  | Efecto sobre la lesión  | Referencia  |
|--|--|---|---|
| Angioplastia (conejo, rata)  | Sobreexpresión arterial de p53 (adenovirus, plásmido)  | Reducción   | Yonemitsu, 1998<br>Scheinman, 1999                    |
| Denudación   | Inactivación global de p53   | Aumento   | Sata, 2003  |
| Arteriosclerosis por trasplante (ratón)  | Inactivación global de p53   | Aumento   | Mayr, 2002  |
| Arteriosclerosis por trasplante (cerdo)  | Sobreexpresión de p53 arterial (adenovirus)  | Aumento del lumen con bloqueo de formación Neointimal                                     | Wan, 2004   |
| Aterosclerosis Inducida por dieta (ratón apoE-KO)  | Inactivación global de p53   | Aumento   | Guevara, 1999<br>Mercer, 2005                         |
| Aterosclerosis Inducida por Dieta tras trasplante en ratón apoE-3Leiden, LDLR-KO o doble deficiente p53 y apoE | Transplante de Médula ósea carente de p53 en ratones Irradiados<br>• apoE*3-Leiden<br>• deficiente en RLDL<br>Transplante de medula ósea p53-silvestre- apoE-KO en ratón doble deficiente p53-apoE | Aumento >vulnerabilidad<br><br>Reducción en la lesión total Idéntica en braquioencefalica | Van Vlijem, 2001<br>Merched, 2003<br><br>Mercer, 2005 |
| Aterosclerosis Inducida por collar perivasculare (ratón apoE-KO)   | Sobreexpresión de p53 (adenovirus) en MLVs de la capa fibrosa  | < capa/intima<br>< matriz colagenosa<br>> Vulnerabilidad                                  | Von der Thüsen, 2002                                  |
| Cultivo de órgano (vena safena humana)   | Sobreexpresión arterial de p53 (adenovirus)  | Reducción   | George, 2001  |

Tabla 2. Efectos de la manipulación de la expresión de p53 sobre el desarrollo de lesiones vasculares obstructivas.

El efecto de sobreexpresar p53 mediante vectores adenovirales ha sido estudiado en lesiones ateromatosas preestablecidas utilizando un modelo experimental denominado collar perivascular (von der Thüsen et al., 2002). Al día siguiente de la transfección se observó una disminución en la proliferación y un aumento de la apoptosis en CMLVs que sobreexpresaban p53 en la cubierta fibrosa. Sin embargo, a los 14 días, ambos parámetros fueron indistinguibles en las CMLVs al comparar ateromas de animales infectados con adenovirus-p53 y adenovirus-β-galactosidasa (control). Tampoco se observaron efectos sobre los macrófagos. A pesar de estos hallazgos, las lesiones infectadas con adeno-p53 presentaron un fenotipo característico de placa vulnerable, consistente en una disminución de la superficie fibrocelular y matriz colagenosa, y menor relación cubierta fibrosa/íntima. Del mismo modo, la sobreexpresión de p53 en conejos con lesiones establecidas (inducidas por una combinación de angioplastia por balón y dieta rica en colesterol), resultó en un incremento de apoptosis celular y contenido de células inflamatorias, y una disminución del contenido de CMLVs y menor grosor de la capa fibrosa, corroborando estudios anteriores en los que se demostró la inducción de inestabilidad de la lesión al sobreexpresar p53 (Chen et al., 2004). Sin embargo, estos resultados parecen contrastar con la mayor vulnerabilidad de la placa observada en ratones transplantados con médula ósea deficiente en p53 (Merched et al., 2003; van Vlijmen et al., 2001).

### **p53 y desarrollo de la neoíntima tras daño mecánico:**

Estudios de sobreexpresión de p53 en arteria carótida sometida a denudación demostraron el papel protector de p53 frente a daño vascular mecánico (Scheinman et al., 1999b; Yonemitsu et al., 1998), efecto que puede deberse en parte a un incremento en la apoptosis en la pared arterial observado a las 48 horas después de la intervención (Scheinman et al., 1999a). Por el contrario, la denudación de la arteria femoral provoca en ratones deficientes en p53 un aceleramiento de la hiperplasia de la neoíntima comparado con ratones silvestres (Sata et al., 2003). Esta respuesta a la inactivación de p53 cursa con menor expresión de p21<sup>Cip1/WAF1</sup>, sin afectarse la apoptosis en la pared arterial lesionada.

**p53 y desarrollo de la neointima tras trasplante:**

Los trasplantes de vena autólogos son una práctica común para revascularizar arterias muy afectadas por arteriosclerosis (derivación o “by-pass”). Sin embargo, su efectividad a medio-largo plazo está limitada frecuentemente debido a la hiperplasia de la neointima que se desarrolla rápidamente en la venas al entrar en contacto con la presión sanguínea arterial (Motwani and Topol, 1998). Los eventos iniciales siguientes al trasplante de venas en territorios arteriales incluyen la apoptosis de las CMLVs, la infiltración de células mononucleares y la proliferación de CMLVs, siendo el balance entre la apoptosis y la proliferación de CMLVs un factor determinante en el desarrollo de la lesión en la arteriosclerosis por trasplante.

En ratones deficientes en p53 sometidos a trasplante de vena se observa un aceleramiento en el desarrollo de la neointima a las 4 semanas de la operación (Mayr et al., 2002). Mientras que las lesiones de los ratones silvestres están formadas mayoritariamente por macrófagos y tienen una matriz acelular, las lesiones de los ratones deficientes en p53 contienen principalmente CMLVs proliferantes y no tienen depósitos de matriz acelular. Además, en ausencia de p53 se observó en el ateroma una baja tasa de apoptosis al comparar con ratones silvestres.

La sobreexpresión de p53 en la superficie luminal de vena safena transplantada provocó un incremento de la luz del vaso y un bloqueo de la formación de la neointima, debido al aumento de apoptosis y a la inhibición de la proliferación de las células de este tejido patológico. Estos cambios fenotípicos se observaron a los 7 y 28 días de la interposición de la vena y se mantuvieron al menos hasta los 3 meses (Wan et al., 2004). No hubo diferencias en la composición celular, en el contenido de colágeno y en la actividad de metaloproteasas. Los autores concluyeron que la inducción de apoptosis en el ateroma es el mecanismo por el cual la sobreexpresión de p53 altera el remodelado de la pared vascular durante la arteriosclerosis por trasplante.

**En resumen, gracias a los estudios con ratones modificados genéticamente se ha podido establecer de manera concluyente una relación causa-efecto entre p53 y arteriosclerosis. La inactivación génica de p53, global o selectivamente en las células hematopoyéticas, acelera el desarrollo del ateroma en la aorta de ratones deficientes en apoE o en RLDL y en ratones transgénicos para apoE\*3-Leiden, así como el desarrollo neointimal tras daño mecánico o trasplante (Guevara et al., 1999; Mayr et al., 2002; Mercer et al., 2005; Merched et al., 2003; Sata et al., 2003; van Vlijmen et al., 2001). Sin embargo, el mecanismo por el que se producen lesiones de mayor tamaño en ausencia de p53 no está totalmente**

esclarecido, existiendo resultados controvertidos respecto a cómo se afecta la proliferación y la apoptosis. También es un tema debatido el efecto de p53 sobre la estabilidad de las lesiones, pues tanto la sobreexpresión de p53 en lesiones ateromatosas previamente establecidas como el TMO carente de p53 conducen a una mayor vulnerabilidad de la lesión (Merched et al., 2003; van Vlijmen et al., 2001; von der Thüsen et al., 2002). Por otra parte, la sobreexpresión de p53 mediante vectores adenovirales inhibe el desarrollo de lesión neointima inducida por angioplastia (Scheinman et al., 1999b; Yonemitsu et al., 1998) y trasplante (Wan et al., 2004).

## **CAPÍTULO 2**

# **JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO Y OBJETIVOS**





El ciclo celular en mamíferos está regulado positivamente por holoenzimas formadas por una subunidad reguladora, denominada ciclina, y una subunidad con actividad quinasa, denominada CDK, que de manera ordenada y específica se activan e inhiben en las diferentes fases del ciclo celular. Además, existen reguladores negativos del ciclo celular. Si bien el control de la proliferación ciclo celular es un proceso muy complejo, se acepta que el balance neto entre reguladores positivos y negativos es un factor clave. La presencia de mitógenos activa inicialmente los complejos ciclina D-CDK4/6, que fosforilan a la proteína Rb y la inactivan, liberándose y activándose el factor E2F. La acumulación de E2F “libre” permite entonces la expresión de genes necesarios para el avance en el ciclo celular (**figura 1, pág. 4**).

La proteína **p27<sup>Kip1</sup>** es una CKI de la familia CIP/KIP que actúa como inhibidor universal de CDKs. Sus niveles son elevados en células en reposo y disminuyen durante la entrada en el ciclo celular inducida por mitógenos. Los niveles de p27<sup>Kip1</sup> están regulados por mecanismos transcripcionales, traduccionales y post-traduccionales. Entre estos últimos destaca la proteólisis dependiente de fosforilación en T187, que degrada p27<sup>Kip1</sup> en el núcleo por la ruta del proteasoma durante la transición G1/S (Pagano et al., 1995). En este proceso, la fosforilación en T187 dependiente del complejo ciclina E-CDK2 (Montagnoli et al., 1999; Morisaki et al., 1997; Sheaff et al., 1997; Vlach et al., 1997) induce la ubiquitinación de p27<sup>Kip1</sup> mediada por el complejo SCF<sup>Skp2</sup> (Carrano et al., 1999; Montagnoli et al., 1999; Nakayama et al., 2004; Nakayama et al., 2001; Tsvetkov et al., 1999) (**figura 2, pág. 7**).

La proteína supresora de tumores **p53** también regula negativamente el ciclo celular. En respuesta a determinados insultos celulares, este factor de transcripción se activa e induce la expresión de genes pro-apoptóticos y anti-proliferativos, y/o reprime genes pro-proliferativos y anti-apoptóticos, de modo que puede desencadenar una respuesta citostática o apoptótica (Somasundaram, 2000) (**figura 4, pág. 11**).

Diversos modelos animales de arteriosclerosis, denudación mecánica y arteriosclerosis por trasplante han demostrado que p27<sup>Kip1</sup> y p53 protegen frente al desarrollo de lesiones vasculares obstructivas, cuya formación depende en parte de una respuesta hiperproliferativa de células de la pared arterial (principalmente CMLVs y macrófagos). Así, trabajos previos de nuestro grupo han demostrado un papel clave de p27<sup>Kip1</sup> en el control de la proliferación y migración de células vasculares y en el desarrollo de la placa de ateroma: 1) La inactivación de p27<sup>Kip1</sup>, tanto global como selectivamente en macrófagos, aumenta la proliferación en la pared arterial y agrava la arteriosclerosis en ratones

apoE-KO hipercolesterolémicos (Díez-Juan and Andrés, 2001; Díez-Juan et al., 2004); 2) La ruta p27<sup>Kip1</sup>/CDK/pRb controla de un modo coordinado la proliferación y migración de CMLVs y fibroblastos, de modo que cambios celulares que ocurren normalmente durante la locomoción celular (formación de lamelipodios, y reorganización de filamentos de actina y adhesiones focales) son inhibidos por p27<sup>Kip1</sup> (Díez-Juan and Andrés, 2003); y 3) Diferencias intrínsecas en los niveles de p27<sup>Kip1</sup> en CMLVs de aorta (ACMLVs) y arteria femoral (FCMLVs) se correlacionan con diferencias en su capacidad proliferativa y migratoria y en la susceptibilidad a desarrollar arteriosclerosis de las arterias de procedencia, de modo que niveles inferiores de p27<sup>Kip1</sup> se asocian con la mayor actividad proliferativa y migratoria de las ACMLVs (y con la mayor propensión a desarrollar ateroma comparado con arteria femoral) (Castro et al., 2003); la reducida expresión de p27<sup>Kip1</sup> en ACMLVs se correlacionó con una acumulación de proteína fosforilada en T187. ***Sin embargo, se desconoce si la fosforilación de p27<sup>Kip1</sup> en T187 afecta al desarrollo de la placa de ateroma.***

En cuanto al papel ateroprotector de p53, ha sido demostrado por diversos autores utilizando estrategias de disrupción génica en modelos murinos de aterosclerosis (tanto espontánea como inducida por dieta rica en grasa y colesterol), y de desarrollo de la neointima tras daño mecánico o trasplante (Guevara et al., 1999; Mayr et al., 2002; Mercer et al., 2005; Merched et al., 2003; Sata et al., 2003; van Vlijmen et al., 2001). Por otra parte, está bien establecido que la sobreexpresión de p53 mediante vectores adenovirales inhibe el desarrollo de lesión neointima inducida por angioplastia (Scheinman et al., 1999b; Yonemitsu et al., 1998) y arteriosclerosis de trasplante (Wan et al., 2004). ***Sin embargo, se desconoce si la ganancia de función de p53 puede limitar el desarrollo del ateroma.***

Con todos estos antecedentes nos planteamos los siguientes objetivos:

**OBJETIVO 1:** Investigar los mecanismos moleculares responsables del efecto citostático que los fármacos PCA-4230 y STI571 ejercen sobre las CMLVs (y sobre células cancerosas) (Capítulo III: **Trabajo 1** y **Trabajo 2**).

**OBJETIVO 2:** Investigar si la fosforilación de la proteína p27<sup>Kip1</sup> en T187 es importante en la regulación del desarrollo del ateroma en ratones deficientes en apoE alimentados con dieta rica en grasa y colesterol (Capítulo III: **Trabajo 3**).

**OBJETIVO 3:** Investigar si la ganancia de función p53 inhibe el desarrollo de la neointima en un modelo murino de aterosclerosis, espontánea o inducida por dieta rica en grasa y colesterol, y en un modelo murino de lesión vascular mecánica (Capítulo III: **Trabajo 4**).



## **CAPÍTULO 3**

### **RESULTADOS**



## TRABAJO 1

### **Inhibition of the cyclin D1/E2F pathway by PCA-4230, a potent repressor of cellular proliferation**

David Goukassian, **Silvia M. Sanz-González**, Ignacio Pérez-Roger, Jaime Font de Mora, Jesús Ureña and Vicente Andrés

**British Journal of Pharmacology 132: 1597-1605 (2001)**

En este trabajo se incluyen los estudios llevados a cabo para cumplir con el **Objetivo 1** de esta Tesis Doctoral: Investigar los mecanismos moleculares responsables del efecto citostático que el fármaco PCA-4230 ejerce sobre las CMLVs y sobre células cancerosas.

**RESUMEN:** La etiopatogénesis de la aterosclerosis y reestenosis post-angioplastia se asocia con una excesiva proliferación de CMLVs. Por tanto, fármacos dirigidos contra el crecimiento patológico de CMLVs podrían ser de utilidad terapéutica para el tratamiento de estas enfermedades. Nuestro objetivo en este trabajo fue investigar los mecanismos moleculares por los que el agente farmacológico PCA-4230 inhibe la proliferación de CMLVs. El tratamiento con PCA-4230 bloqueó la inducción de la expresión de la ciclina D1 y de la ciclina A observada en CMLVs re-estimuladas con suero. Además, el fármaco inhibió la actividad de CDK2 e impidió la hiperfosforilación de Rb. De un modo similar, la inhibición de la proliferación de líneas celulares transformadas en presencia de PCA-4230 cursó con una disminución en los niveles de la proteína ciclina D1 y una inhibición de la actividad CDK2. De acuerdo con estos hallazgos, el PCA-4230 reprimió la actividad del promotor de la ciclina A en presencia de suero, mientras que la sobreexpresión de ciclina D1 o E2F rescataba de modo eficaz este efecto inhibitor del PCA-4230. Asimismo, la sobreexpresión de E2F1 restauró la entrada en fase S de CMLVs tratadas con PCA-4230. Nuestros resultados demuestran que el efecto inhibitor de PCA-4230 sobre la transcripción del gen de la ciclina A y la proliferación de las CMLVs está mediado por la represión de la ruta ciclina D1/E2F.







# Inhibition of the cyclin D1/E2F pathway by PCA-4230, a potent repressor of cellular proliferation

<sup>1</sup>David Goukassian, <sup>2</sup>Silvia M. Sanz-González, <sup>2</sup>Ignacio Pérez-Roger, <sup>3</sup>Jaime Font de Mora, <sup>4</sup>Jesús Ureña & <sup>\*,2</sup>Vicente Andrés

<sup>1</sup>Department of Dermatology, Boston University School of Medicine, Boston, Massachusetts, MA 02118, U.S.A.; <sup>2</sup>Unit of Vascular Biology, Instituto de Biomedicina de Valencia (IBV-CSIC), Spanish Council for Scientific Research, 4610-Valencia, Spain; <sup>3</sup>Centro de Investigación del Cáncer, Campus 'Miguel de Unamuno', 37007-Salamanca, Spain and <sup>4</sup>Departamento de Biología Celular, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona, 08028-Barcelona, Spain

**1** Tight control of cellular growth is essential to ensure normal tissue patterning and prevent pathological responses. Excessive vascular smooth muscle cell (VSMC) proliferation is associated with the pathophysiology of atherosclerosis and restenosis post-angioplasty. Thus, drug targeting of pathological VSMC growth may be a suitable therapeutic intervention in vascular proliferative diseases.

**2** In the present study, we investigated the mechanisms underlying VSMC growth arrest induced by the pharmacological agent PCA-4230. Addition of PCA-4230 to cultured VSMCs blocked the induction of cyclin D1 and cyclin A expression normally seen in serum-restimulated cells. Moreover, PCA-4230 inhibited cyclin-dependent kinase 2 (CDK2) activity and abrogated hyperphosphorylation of the retinoblastoma (Rb) gene product. Similarly, PCA-4230-dependent growth arrest of transformed cell lines correlated with reduced level of cyclin D1 protein and inhibition of CDK2 activity. Consistent with these findings, PCA-4230 repressed serum-inducible cyclin A promoter activity, and overexpression of either cyclin D1 or E2F1 efficiently circumvented this inhibitory effect. Importantly, adenovirus-mediated overexpression of E2F1 restored S-phase entry in PCA-4230-treated VSMCs, demonstrating that PCA-4230 represses cyclin A gene expression and VSMC growth *via* inhibition of the cyclin D1/E2F pathway.

**3** Because of its ability to inhibit the growth of human VSMCs and transformed cell lines, future studies are warranted to assess whether PCA-4230 may be a suitable therapeutic intervention for the treatment of hyperproliferative disorders, including cardiovascular disease and cancer.

*British Journal of Pharmacology* (2001) **132**, 1597–1605

**Keywords:** PCA-4230; 1,4-dihydropyridine; vascular smooth muscle cells; tumour cells; cell cycle

**Abbreviations:** Ad-E2F1 (Ad- $\beta$ gal), replication-defective adenovirus encoding for E2F1 ( $\beta$ -galactosidase); CDK(s), cyclin-dependent kinase(s); DMSO, dimethyl sulphoxide; MEF, mouse embryonic fibroblast; MEF-Myc, mouse embryonic fibroblast transformed with the proto-oncogen *Myc*; Rb, retinoblastoma susceptibility gene product; TCA, trichloroacetic acid; VSMC(s), vascular smooth muscle cell(s)

## Introduction

Cell cycle progression is controlled by several cyclin-dependent kinases (CDKs) that associate with regulatory subunits called cyclins (Nurse, 1994; Morgan, 1995). Active CDK/cyclin holoenzymes are presumed to hyperphosphorylate the retinoblastoma (Rb) gene product and the related pocket proteins p107 and p130. The interaction among members of the E2F family of transcription factors and individual pocket proteins is a complex regulatory event that determines whether E2F proteins function as transcriptional activators or repressors (Helin & Harlow, 1993; Weinberg, 1995; Dyson, 1998; Mayol & Graña, 1998; Lavia & Jansen-Durr, 1999). It is accepted that phosphorylation of pocket proteins from mid G1 to mitosis is involved in the transactivation of genes with functional E2F-binding sites. The genes activated by E2F include several growth and cell-cycle regulators (i.e., *c-myc*, Rb, p34<sup>cdc2</sup>, cyclin E, cyclin A),

as well as genes encoding proteins that are required for nucleotide and DNA biosynthesis (i.e., DNA polymerase  $\alpha$ , histone H2A, proliferating cell nuclear antigen, thymidine kinase) (Lavia & Jansen-Durr, 1999).

Excessive proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMCs) is considered a key event in the pathophysiology of vascular proliferative diseases (Ross, 1993; Bauters & Isner, 1997; Andrés, 1998). In the adult organism, at homeostasis, VSMCs are found in a 'contractile' phenotype characterized by the expression of a unique repertoire of differentiation markers and an extremely low proliferation index (Owens, 1995). Numerous observations have suggested that VSMCs in primary atheromas and restenotic lesions have changed to a 'synthetic' state in which they can respond to different growth factors and cytokines that induce cellular hyperplasia (Campbell & Campbell, 1990; Ross, 1993). Therefore, drug targeting of pathological VSMC growth may be a suitable therapeutic intervention in vascular proliferative diseases.

\*Author for correspondence.

PCA-4230 is a dihydropyridine derivative showing antithrombotic activity that has long lasting although reversible effects (Gutierrez Diaz *et al.*, 1992; Ortega *et al.*, 1993). A recent study demonstrated the ability of PCA-4230 to reversibly inhibit serum-inducible proliferation of cultured rat VSMCs (del Rio *et al.*, 1997). However, neither the mechanism underlying the antimitogenic effect of PCA-4230 on VSMCs, nor its effect on the proliferation of human VSMCs have been reported. In the present study we demonstrate that PCA-4230 suppresses cyclin A gene transcription and VSMC proliferation *via* inhibition of the cyclin D1/E2F1 pathway. We also show that PCA-4230 inhibited, in a dose-dependent manner, the growth of human VSMCs and transformed cell lines.

## Methods

### *Cell culture, flow cytometry and <sup>3</sup>H-thymidine incorporation*

Human VSMCs were isolated from saphenous vein (Pickering *et al.*, 1992). E19P cells (gift from C. Shanahan, Addenbrooke's Hospital, Cambridge, U.K.) were obtained from explant cultures of embryonic day 19 aorta from Fisher rats. These cells express SM22 $\alpha$ , calponin and SM- $\alpha$ -actin mRNAs. Human cancer cell lines MCF7 (breast adenocarcinoma) and U2OS (primary bone osteosarcoma) were purchased from American Type Culture Collection (Manassas, VA, U.S.A.). Primary mouse embryonic fibroblasts transformed with the c-Myc oncoprotein were generated as previously described (Perez-Roger *et al.*, 1999). VSMCs were maintained in M199 medium supplemented with 10% FBS. For serum starvation, VSMCs were maintained for 3 days in 0.5% FBS/M199. Transformed cell lines were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% FBS. Cultures were maintained at 37°C (95% air and 5% CO<sub>2</sub>).

PCA-4230 (2(1, 1, 3-trioxo-2, 3-dihydro-1, 2-benzisothiazol-2-yl)ethyl 2, 6-dimethyl-5-(ethoxycarbonyl)-4-methyl-1, 4-dihydropyridincarboxylate) (gift from M.P. Ortega, Laboratorios Alter, Madrid, Spain) was dissolved in dimethyl sulphoxide (DMSO) and immediately used at a dilution giving a final concentration of 0.1% DMSO. Control cells were treated with 0.1% DMSO. Media were changed daily throughout the experiments. For flow cytometric analysis, PCA-4230 or vehicle was administered to starvation-synchronized cells 1–2 h before serum restimulation and throughout the 16 h of serum treatment. Flow cytometric analysis was performed as previously described (Sylvester *et al.*, 1998).

For experiments with adenovirus encoding for E2F1 or  $\beta$ -galactosidase (provided by J.R. Nevins, Duke University Medical Center, NC, U.S.A.), cells were seeded in 6-well dishes ( $25 \times 10^3$  cells/well) and were maintained in 10% v v<sup>-1</sup> FBS. Two days later, cells were starvation-synchronized and harvested for FACS analysis, or were pretreated with DMSO or 50  $\mu$ M PCA-4230 followed by 16 h of serum restimulation. When indicated, starved cells were infected with adenovirus at different multiplicities of infection (MOI) during the last 8 h prior to serum restimulation.

To assess the effect of PCA-4230 on DNA synthesis in MEF-Myc cultures, cells were seeded in 12-well dishes at a

density of  $60 \times 10^3$  cells/well in 10% FBS/DMEM supplemented with vehicle or PCA-4230. The following day, cells were treated for 2 h with 1  $\mu$ Ci ml<sup>-1</sup> of <sup>3</sup>H-thymidine (Amersham Pharmacia, Little Chalfont, U.K.). The amount of <sup>3</sup>H-thymidine incorporated into DNA was determined by precipitation with trichloroacetic acid and scintillation counting.

### *Western blot analysis, immunoprecipitation and immune complex kinase assays*

Cells were lysed in ice-cold lysis buffer (20 mM HEPES buffer [pH 7.5], 10 mM EGTA, 40 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 1% v v<sup>-1</sup> NP-40, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM orthovanadate, 1 mM DTT, 1 mM phenylmethyl sulfonyl fluoride, 10  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> aprotinin and 10  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> leupeptin). Following centrifugation at 15,000  $\times g$  for 20 min at 4°C, supernatants were recovered. Western blot and CDK2 assays were performed as previously described (Chen *et al.*, 1997) using the following dilutions of primary antibodies: anti-CDK2 (sc-163, 1/250), anti-cyclin A (sc-751, 1/100), anti-cyclin D1 (sc-450, 1/100), anti-cyclin E (sc-481, 1/250), anti-p27 (sc-528, 1/1000), and anti-p21 (sc-397, 1/250) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, U.S.A.). Rb was detected using a 1/1000 dilution of monoclonal antibody 3C8 (Wen *et al.*, 1994).

For phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) assay, lysates containing 1 mg of total protein were immunoprecipitated with 0.5  $\mu$ g of anti-PI3K antibody (anti-p85 $\alpha$ , sc-423, Santa Cruz Biotechnology). The reaction was started by mixing the immunopellet with 25  $\mu$ l of a cocktail containing 20  $\mu$ g L- $\alpha$ -phosphatidylinositol (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, U.S.A.), 100 mM [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (10  $\mu$ Ci) and 40  $\mu$ M ATP in 25 mM HEPES [pH 7.4]; 10 mM MgCl<sub>2</sub> and 0.5 mM EGTA. After 20 min the reaction was stopped by addition of 400  $\mu$ l of chloroform-methanol (1:2 in 1% HCl), plus 125  $\mu$ l of chloroform and 125  $\mu$ l of 10 mM HCl. Samples were centrifuged briefly and the lower organic phase was removed and washed once with 500  $\mu$ l of methanol: 100 mM HCl plus 2 mM EDTA (1:1). The organic lower phase was extracted, dried under vacuum and resuspended in 30  $\mu$ l of chloroform. Samples were applied to silica gel thin-layer chromatography plates (Merck, Darmstadt, Germany). The chromatography was developed with 1-propanol: 2N acetic acid (65:35 v v<sup>-1</sup>), dried and visualized by autoradiography. The amount of radioactivity incorporated into L- $\alpha$ -phosphatidylinositol phosphate was quantified in a Phosphoimager.

### *Transient transfections assays*

E19P cells seeded into 6-well dishes were transiently transfected with Superfect as recommended by the manufacturer (Quiagen, Santa Clarita, CA, U.S.A.) (1:2 DNA:-Superfect ratio). The luciferase reporter plasmid driven by the human cyclin A promoter region from -924 to +245 (gift of Sobczak-Thépot, INSERM, France) has been described previously (Henglein *et al.*, 1994). Final DNA concentration in experiments involving cotransfected expression vectors for cyclin D1 and E2F1 driven by the cytomegalovirus promoter (gift of K. Walsh, St. Elizabeth's Medical Center of Boston, MA, U.S.A.) was equalized by adding empty vector. To correct for differences in transfection efficiency, luciferase activity was normalized relative to the level of alkaline

phosphatase activity produced from cotransfected pSVAPAP plasmid (Henthorn *et al.*, 1988). Luciferase and alkaline phosphatase activities were measured as previously described (Andrés *et al.*, 1995).

**Results**

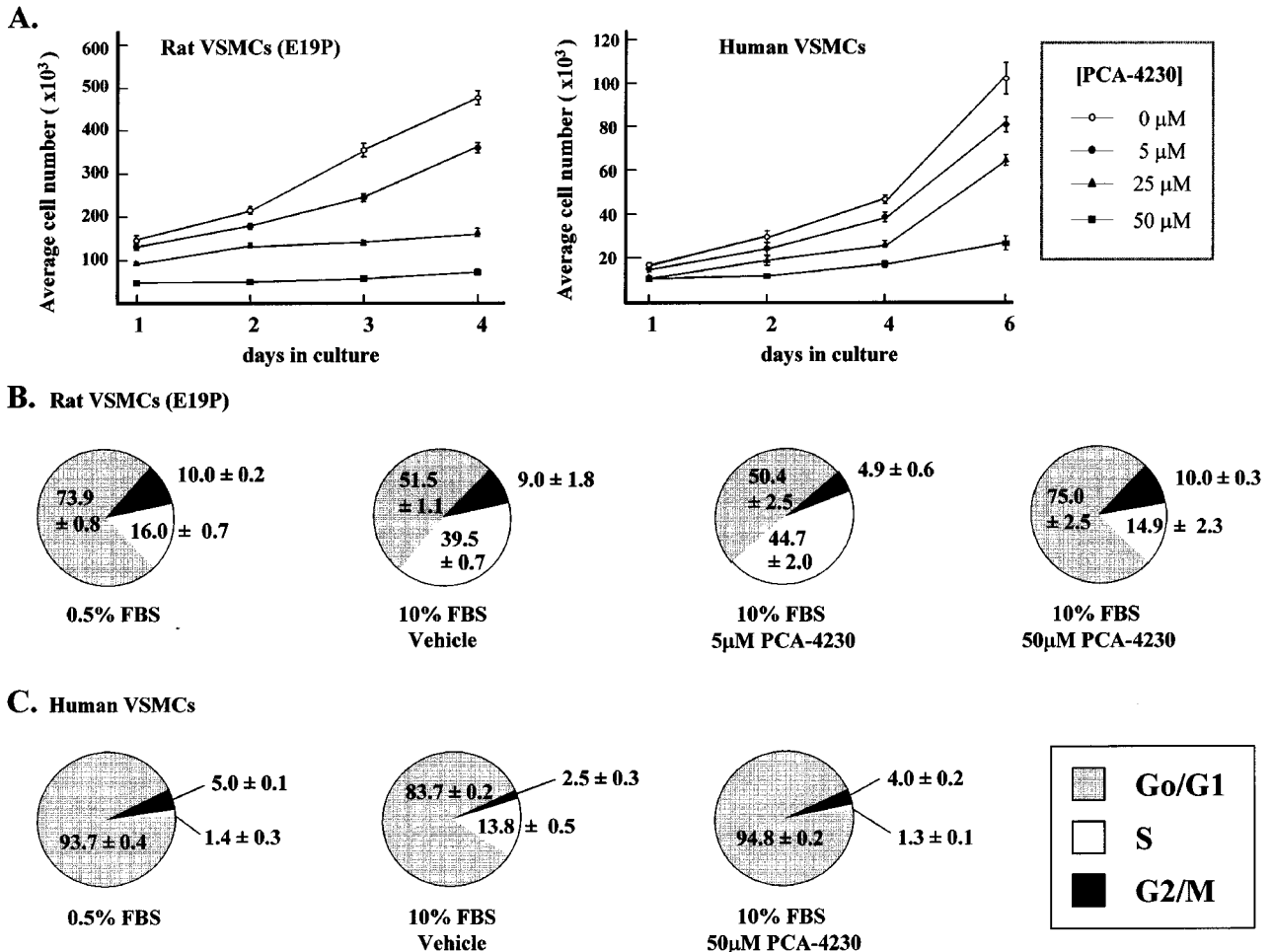
*PCA-4230 inhibits the proliferation of cultured VSMCs and transformed cell lines*

We first examined the effect of PCA-4230 on the kinetics of proliferation of cultured VSMCs. E19P cells, an established cell line of rat embryonic aorta VSMCs, and primary cultures of human VSMCs were maintained in high-mitogen media. Addition of PCA-4230 reduced cell number in a dose-dependent manner over a period of 4–6 days in culture (Figure 1A). For example, when compared to control cultures at the latest time points investigated, 5  $\mu\text{M}$  PCA-4230 decreased the number of E19P cells and human VSMCs by 25 and 21%, respectively, whereas 50  $\mu\text{M}$  PCA-4230 reduced

E19P and human VSMC number by 85 and 74%, respectively.

We next performed flow cytometry to analyse the effect of PCA-4230 on cell cycle profiles. After pretreatment with vehicle or PCA-4230, starvation-synchronized cells were restimulated with medium containing 10% FBS and vehicle or PCA-4230. Analysis after 16 h of serum restimulation disclosed a dose-dependent inhibition of S-phase in E19P cells treated with PCA-4230 (Figure 1B). Likewise, under conditions where serum-restimulation markedly increased S-phase entry of human VSMCs, 50  $\mu\text{M}$  PCA-4230 completely blocked this response (Figure 1C). Thus, PCA-4230-dependent inhibition of rat and human VSMC growth is associated with G0/G1 arrest.

The effect of PCA-4230 on the growth of transformed cell lines was also investigated. Addition of PCA-4230 to the culture media reduced in a dose-dependent manner the number of MCF7 cells (human breast adenocarcinoma), U2OS cells (human osteosarcoma), and mouse embryonic fibroblast transformed with the proto-oncogene c-Myc (MEF-Myc) (Figure 2A,B). The inhibitory effect of PCA-



**Figure 1** PCA-4230 inhibits serum-inducible proliferation of rat and human VSMCs. Results represent the mean  $\pm$  s.e. mean of three independent measurements. (A) The rat E19P cell line and primary human VSMCs were plated into 6-well dishes and maintained with medium containing 10% FBS plus vehicle or PCA-4230. Cells were trypsinized at different times and cell number was determined with a haemocytometer. (B, C) Cells were starved for 3 days in medium containing 0.5% FBS. After pretreatment with vehicle or PCA-4230, cells were stimulated with 10% FBS plus vehicle or PCA-4230. Cells were harvested for FACS analysis after 16 h of serum stimulation.

4230 on the growth of MEF-Myc cells correlated with a marked reduction in  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation (Figure 2C). In agreement with previous studies (del Rio *et al.*, 1997), PCA-4230-treated cultures resumed growth if drug treatment was discontinued (data not shown).

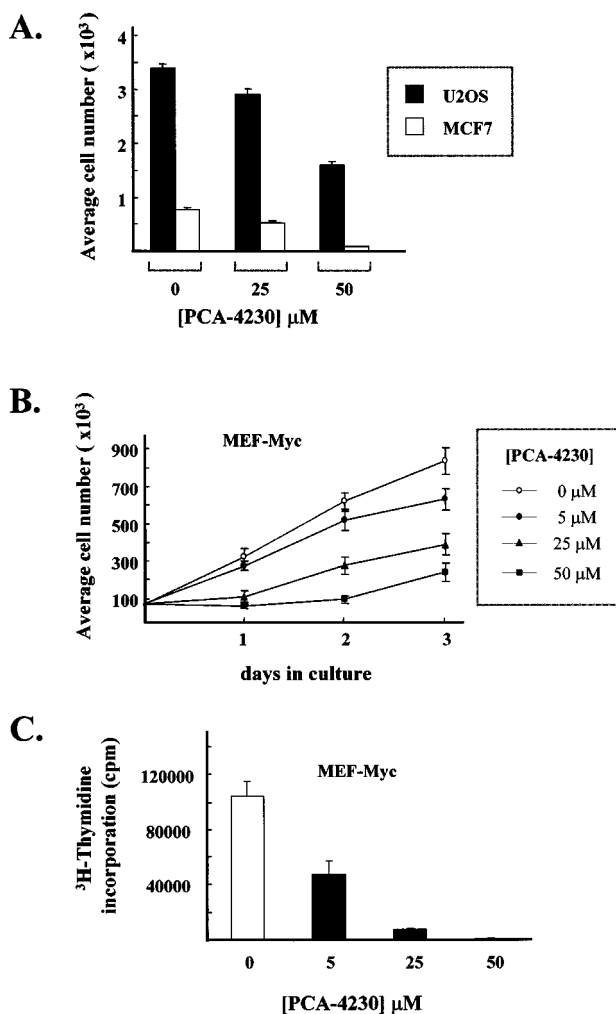
#### Effects of PCA-4230 on the expression and activity of key cell cycle regulatory proteins

To gain insight into the mechanisms underlying PCA-4230-dependent inhibition of cell proliferation, we investigated the effect of this drug on the activity of CDK2, a key positive regulator of the G1/S transition. Concentrations of PCA-4230 that caused growth arrest markedly reduced CDK2 activity in serum-stimulated VSMCs and MEF-Myc cells (Figure 3A). In contrast, PI3K activity in VSMCs exposed to 20 and 50  $\mu\text{M}$  was 89 and 96% of that seen in control cells,

respectively (Figure 3B). Consistent with these findings, PCA-4230 did not affect the phosphorylation status of the PI3K substrate Akt (data not shown). Collectively, these results indicate that PCA-4230 may act specifically to block certain signalling pathways involved in mitogen-induced cell growth.

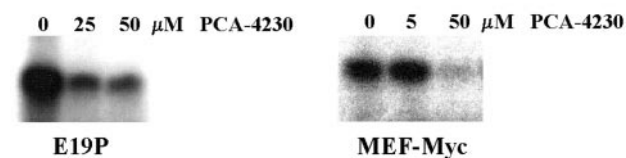
We next sought to examine by Western blot analysis the effect of PCA-4230 on key components of the cell cycle machinery (Figure 4). As expected, serum restimulation of starvation-synchronized VSMCs led to a transient induction of cyclin D1 protein expression that showed maximum levels at 8 h and was followed by the upregulation of cyclin A at 16 h (Figure 4A, lanes 1, 3, 5 and 7). Addition of PCA-4230 markedly inhibited serum-inducible cyclin D1 and cyclin A expression (Figure 4A, lanes 2, 4, 6 and 8). Neither serum restimulation nor PCA-4230 treatment affected significantly the expression of cyclin E and CDK2 (Figure 4A). Thus, the remaining CDK2 activity in PCA-4230-treated cells might result from cyclin E-containing CDK2 holoenzymes. PCA-4230-dependent inhibition of the level of cyclin D1 protein was also seen in MEF-Myc cells (Figure 4B).

Progression through the mammalian cell cycle requires the hyperphosphorylation of Rb by active CDK/cyclin holoenzymes (Helin & Harlow, 1993; Weinberg, 1995; Dyson, 1998; Mayol & Graña, 1998). Consistent with its inhibitory effect on CDK2 activity and the reduction in cyclin D1 protein, PCA-4230 abrogated the hyperphosphorylation of Rb normally seen in serum-restimulated VSMCs (Figure 4, compare lanes 1, 3, 5, 7 and 2, 4, 6, 8). Therefore, growth arrest of PCA-4230-treated cells is associated with inhibition of the kinase activity of CDK2 and repression of Rb hyperphosphorylation. Since CDK2 activity and Rb hyperphosphorylation are negatively regulated by specific CDK inhibitors (CKIs) (Elledge & Harper, 1994; Peter & Herskowitz, 1994; Graña & Reddy, 1995; Morgan, 1995), we considered the possibility that members of this family of growth suppressors might underlie the growth inhibitory effect of PCA-4230. However, growth arrest in cells exposed to PCA-4230 did not correlate with increased expression of the CKIs p21 and p27 (Figure 4C,D).

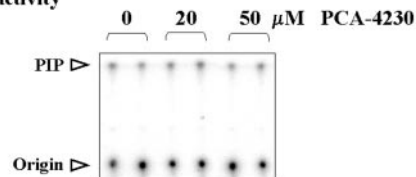


**Figure 2** PCA-4230 inhibits proliferation of transformed cells. Cells were maintained in medium containing 10% FBS plus vehicle or PCA-4230. Results represent the mean  $\pm$  s.e. mean of three independent measurements. (A) U2OS and MCF7 cells were plated in 6-well dishes. After 3 days, cells were trypsinized and cell number was determined with a haemocytometer. (B) MEF-Myc cells growing on 6-well dishes were trypsinized at different times and cell number was determined with a haemocytometer. (C) Effect of PCA-4230 on the incorporation of  $^3\text{H}$ -thymidine into MEF-Myc cells (see Methods for details).

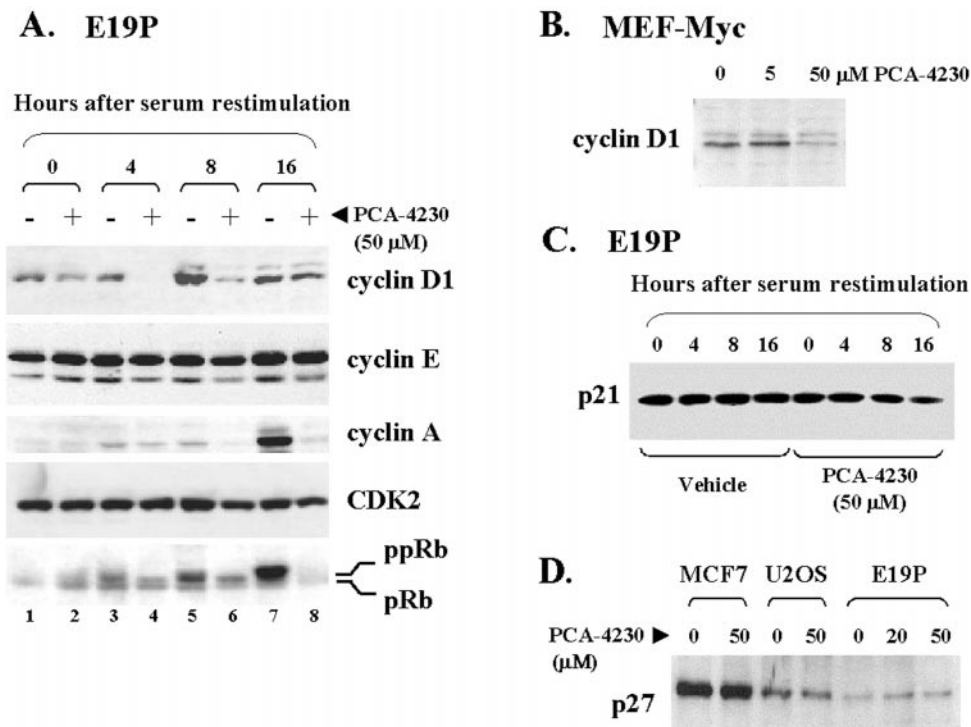
#### A. CDK2 activity



#### B. PI3K activity



**Figure 3** PCA-4230 inhibits CDK2 activity. Subconfluent E19P and MEF-Myc cells maintained in 10% FBS were treated for 15 h with vehicle or the indicated amounts of PCA-4230. (A) Cell lysates were assayed for CDK2 activity using histone H1 as substrate. (B) PI3K activity in E19P lysates using  $L$ - $\alpha$ -phosphatidylinositol as substrate. PIP:  $L$ - $\alpha$ -phosphatidylinositol phosphate.



**Figure 4** Western blot analysis of cell cycle regulatory proteins in PCA-4230-treated cells. Control cultures were exposed to vehicle. (A, C) E19P cells were starvation-synchronized for 3 days in medium containing 0.5% FBS. One-and-a-half hours before serum-restimulation, 50 μM PCA-4230 was added and treatment continued throughout the period of serum restimulation. The antibody used in each blot is shown. pRb: hypophosphorylated Rb; ppRb: hyperphosphorylated Rb. (B) Cyclin D1 expression in asynchronously growing MEF-Myc cells. (D) p27 expression in asynchronously growing MCF7, U2OS and E19P cells.

#### *PCA-4230 inhibits serum-inducible cyclin A promoter activity*

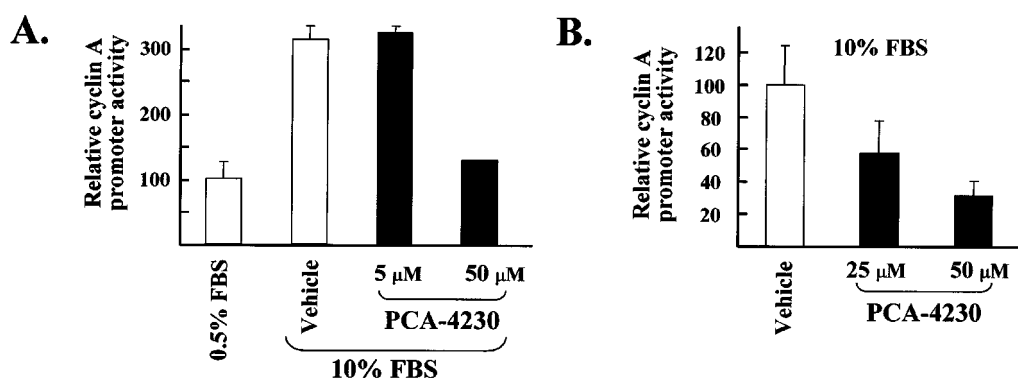
Hyperphosphorylation of Rb is necessary to induce transcriptional activation of E2F-dependent target genes that are required for DNA synthesis (Helin & Harlow, 1993; Weinberg, 1995; Dyson, 1998; Mayol & Graña, 1998). Since PCA-4230 inhibited Rb hyperphosphorylation (Figure 4), a series of experiments were performed to examine the effect of PCA-4230 on transcriptional activation of the cyclin A gene, a known E2F-regulated gene which is induced by serum in VSMCs (Sylvester *et al.*, 1998). To this end, E19P cells were transiently transfected with a luciferase reporter gene driven by the cyclin A gene promoter. These experiments demonstrated the ability of PCA-4230 to abrogate, in a dose-dependent manner, serum-inducible cyclin A promoter activity in starvation-synchronized cells (Figure 5A). Likewise, addition of PCA-4230 to asynchronously growing E19P cells inhibited in a dose-dependent manner cyclin A promoter activity (Figure 5B). These results suggest that PCA-4230-dependent inhibition of cyclin A gene expression is achieved, at least in part, at the transcriptional level.

#### *Ectopic overexpression of cyclin D1 and E2F1 overrides the inhibitory effect of PCA-4230 on cyclin A promoter activity and S-phase entry*

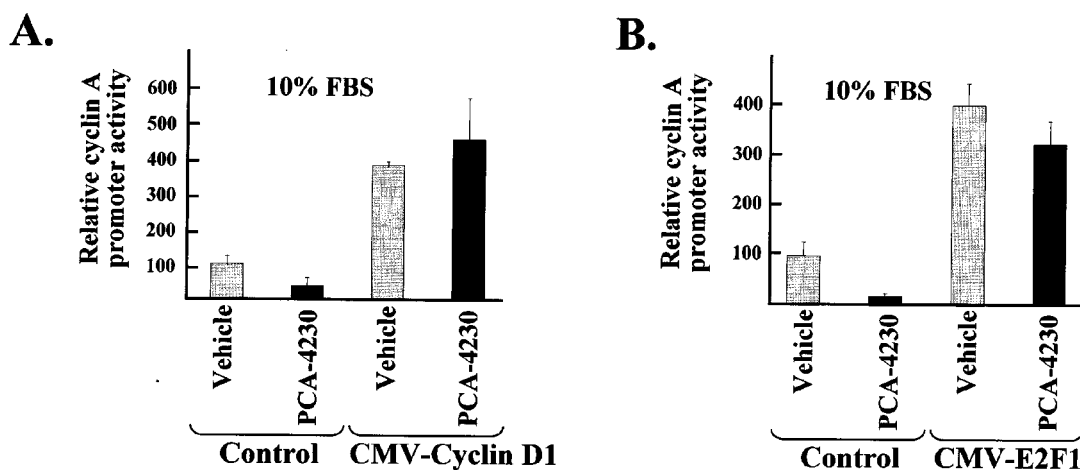
The results of our Western blot analysis and transient transfection assays suggested that PCA-4230-dependent

transcriptional repression of cyclin A gene expression and growth arrest is due, at least in part, to inhibition of the cyclin D1/E2F pathway. Further evidence in support of this model was provided by rescue experiments in which the luciferase reporter gene driven by the cyclin A gene promoter was cotransfected with either cyclin D1 or E2F1 expression vectors. In agreement with previous studies demonstrating the ability of cyclin D1 and E2F1 to induce transcription from the cyclin A gene promoter in fibroblasts (Schulze *et al.*, 1995; Rudolph *et al.*, 1996; Zeffass-Thome *et al.*, 1997; Lavia & Jansen-Durr, 1999), overexpression of cyclin D1 and E2F1 increased cyclin A promoter activity by 4 fold in serum-stimulated VSMCs (Figure 6A,B, respectively; compare gray bars). While PCA-4230 repressed cyclin A promoter activity in control cells, ectopic overexpression of either cyclin D1 (Figure 6A) or E2F1 (Figure 6B) efficiently overcame the inhibitory effect of PCA-4230.

We next wanted to ascertain whether ectopic overexpression of E2F1 could overcome PCA-4230-dependent growth arrest. For these studies, we used a replication-defective adenovirus encoding for E2F1 (Ad-E2F1). Consistent with the results of Figure 1B, 50 μM PCA-4230 blocked the induction of S-phase normally seen in serum-restimulated E19P cells, and infection with Ad-E2F1, but not control adenovirus encoding for β-galactosidase (Ad-βgal), overcame in a dose-dependent manner PCA-4230-induced growth arrest (Figure 7). Taken together, these results suggest that PCA-4230 represses cyclin A promoter activity and cell proliferation through inhibition of the cyclin D1/E2F1 pathway.



**Figure 5** PCA-4230 inhibits serum-inducible cyclin A promoter activity in VSMCs. E19P cells were cotransfected with 2  $\mu$ g of a luciferase reporter gene driven by the human cyclin A promoter and 0.5  $\mu$ g of a control plasmid encoding for alkaline phosphatase. Results are expressed as the ratio luciferase/alkaline phosphatase. Bars represent the mean  $\pm$  s.e. mean of three independent transfections. Control cells were treated with vehicle. Results are referred to the activity seen in control untreated cells (=100%). (A) Transfected cells were maintained in 0.5% FBS for 2 days. Cells were then harvested to determine basal cyclin A promoter activity in serum-starved cells (first bar), or were pretreated for 2 h with vehicle or PCA-4230 and then serum-restimulated overnight. (B) Cells were maintained in 10% FBS throughout the experiment.



**Figure 6** Ectopic overexpression of either cyclin D1 or E2F1 can overcome the inhibitory effect of PCA-4230 on cyclin A promoter activity. Cells were treated as in Figure 5, except that cultures were maintained throughout the experiment in 10% FBS with vehicle or with 50  $\mu$ M PCA-4230. Results are expressed as the ratio luciferase/alkaline phosphatase. Bars represent the mean  $\pm$  s.e. mean of three independent transfections. Results are referred to the activity seen in control untreated cells (=100%). Cells were cotransfected with CMV-Cyclin D1 (0.1  $\mu$ g per transfection, A), or with CMV-E2F1 (0.2  $\mu$ g per transfection, B).

## Discussion

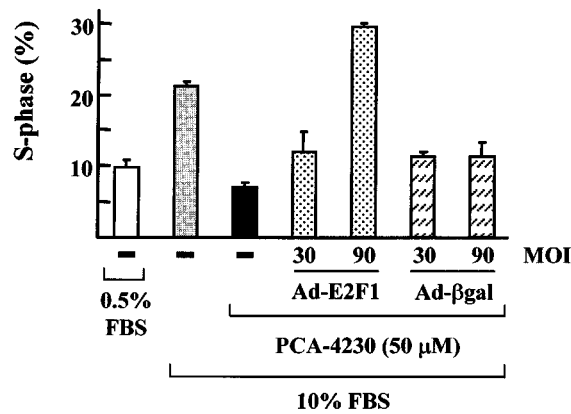
In this study we have examined the molecular mechanisms underlying cellular growth arrest by the pharmacological agent PCA-4230. Our results show that PCA-4230 is a potent inhibitor of serum-inducible S-phase entry in cultures of both rat and human VSMCs. This agent also inhibited the growth of human and murine transformed cells. Potential mechanisms underlying PCA-4230-dependent growth arrest include: (i) inhibition of cyclin D1 and cyclin A protein expression; (ii) abrogation of CDK2 activity and blockade of Rb hyperphosphorylation; and (iii) transcriptional repression of cyclin A gene expression. Neither PI3K activity nor cyclin E and CDK2 protein levels were affected by PCA-4230. Moreover, PCA-4230 failed to inhibit CDK2 activity when added directly to kinase reactions (data not shown), demonstrating

that the inhibitory effect of this agent was not due to a direct interaction with CDK2. These results indicate that PCA-4230 blocks specifically certain signalling pathways involved in cellular proliferation.

We considered the possibility that members of the CKI family of growth suppressors might contribute to PCA-4230-dependent growth arrest. However, increased expression of the CKIs p21 and p27 was not seen in PCA-4230-treated cells. In contrast, tranilast, a compound with proven clinical efficacy for treating postangioplasty restenosis (Holmes *et al.*, 2000; Tamai *et al.*, 1999), inhibited CDK2/CDK4 activity and Rb hyperphosphorylation by a mechanism that may depend upon increased expression of p21 (Takahashi *et al.*, 1999).

The complex interactions between Rb and members of the E2F family of transcription factors play an important role in

| Treatment |          |                  | Cell cycle profile (%) |            |            |
|-----------|----------|------------------|------------------------|------------|------------|
| [FBS]     | PCA-4230 | Adenovirus       | G0/G1                  | S          | G2/M       |
| 0.5%      | -        | -                | 83.65±0.80             | 9.96±0.85  | 6.41±0.29  |
| 10%       | -        | -                | 64.51±0.99             | 21.28±0.60 | 14.21±0.39 |
| 10%       | 50 µM    | -                | 85.81±0.20             | 7.06±0.58  | 7.13±0.78  |
| 10%       | 50 µM    | Ad-E2F1 (30 MOI) | 82.70±1.37             | 12.09±2.74 | 5.20±1.52  |
| 10%       | 50 µM    | Ad-E2F1 (90 MOI) | 66.43±0.80             | 29.66±0.49 | 3.91±0.80  |
| 10%       | 50 µM    | Ad-βgal (30 MOI) | 85.48±1.19             | 11.32±0.74 | 3.20±1.06  |
| 10%       | 50 µM    | Ad-βgal (90 MOI) | 81.30±2.28             | 11.31±2.11 | 7.38±0.38  |



**Figure 7** Adenovirus-mediated overexpression of E2F1 restores S-phase entry in PCA-4230-treated VSMCs. E19P cells were maintained for 3 days in 0.5% FBS. Cells were then harvested for FACS analysis to determine basal activity (first bar), pretreated with vehicle or 50 µM PCA-4230 followed by 16 h of stimulation with 10% FBS. When indicated, starved cells were infected with replication-defective Ad-E2F1 or Ad-βgal at different multiplicities of infection (MOI) during the last 8 h of serum starvation. Results represent the mean ± s.e.mean of three experiments.

the regulation of cell cycle progression (Graña & Reddy, 1995; Dyson, 1998). It is accepted that hyperphosphorylation of Rb by active G1 CDK/cyclin holoenzymes disrupts Rb/E2F interactions thus allowing transcriptional activation of E2F-dependent target genes (i.e., cyclin A, p34<sup>cdc2</sup>, cyclin E). Thus, inhibition of both cyclin D1 expression and CDK2 activity may account for the blockade of serum-inducible Rb hyperphosphorylation in PCA-4230-treated VSMCs. Accumulation of hypophosphorylated Rb would in turn hinder the accumulation of 'free E2F', thus preventing cyclin A gene expression and formation of active CDK2/cyclin A complexes. In this regard, we have recently shown that E2F is an important component of the signalling cascade that links Ras activity to cyclin A transcription in VSMCs (Sylvester *et al.*, 1998). Because disruption of cyclin A function inhibits S-phase entry (Girard *et al.*, 1991; Pagano *et al.*, 1992; Zindy *et al.*, 1992), and its overexpression accelerates the G1-to-S transition (Resnitzky *et al.*, 1995; Rosenberg *et al.*, 1995), cyclin A expression appears to be rate limiting for cellular proliferation. Therefore, repression of cyclin A gene transcription may contribute to PCA-4230-dependent inhibition of VSMC proliferation.

To ascertain that PCA-4230 does indeed inhibit cyclin A gene expression and VSMC proliferation through inhibition

of the cyclin D1/E2F pathway, we performed rescue experiments by overexpressing cyclins D1 and E2F1. Our results demonstrate that ectopic overexpression of either cyclin D1 or E2F1 efficiently overcame the inhibitory effect of PCA-4230 on cyclin A promoter activity. Moreover, adenovirus-mediated overexpression of E2F1 restored DNA synthesis in PCA-4230-treated VSMCs. These results suggest that PCA-4230 represses cyclin A promoter activity and VSMC proliferation through inhibition of the cyclin D1/E2F1 pathway.

Abnormal VSMC proliferation is an important component of the response to vascular injury, particularly during in-stent restenosis (Ross, 1993; Bauters & Isner, 1997; Libby & Tanaka, 1997). We have previously shown that VSMC proliferation in response to arterial injury in rat and human arteries correlated with the induction of CDK2 and cyclins (Kearney *et al.*, 1997; Wei *et al.*, 1997). Importantly, gene therapy strategies targeting CDK2 and E2F function and Rb hyperphosphorylation have proven efficient at preventing vascular proliferative diseases in animal models (reviewed in Andrés, 1998; Braun-Dullaeus *et al.*, 1998) and human bypass-graft atherosclerosis (Mann *et al.*, 1999). Previous studies have demonstrated that PCA-4230 has platelet aggregation inhibitory activity and *in vivo* antithrombotic

activity (Gutierrez Diaz *et al.*, 1992; Ortega *et al.*, 1993; Sunkel *et al.*, 1988). Our *in vitro* studies show that inhibition of the cyclin D1/E2F pathway by PCA-4230 is effective at suppressing the growth of human VSMCs and cancer cells. Because PCA-4230 was well tolerated when administered to healthy volunteers (Cillero *et al.*, 1991), future studies are warranted to assess whether PCA-4230 may be a suitable pharmacological agent for the treatment of hyperproliferative disorders, including cardiovascular disease and cancer.

## References

- ANDRÉS, V. (1998). Control of vascular smooth muscle cell growth and its implication in atherosclerosis and restenosis. *Int. J. Molec. Med.*, **2**, 81–89.
- ANDRÉS, V., FISHER, S., WEARSCH, P. & WALSH, K. (1995). Regulation of *Gax* homeobox gene transcription by a combination of positive factors including MEF2. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 4272–4281.
- BAUTERS, C., & ISNER, J.M. (1997). The biology of restenosis. *Prog. Cardiovasc. Dis.*, **40**, 107–116.
- BRAUN-DULLAEUS, R.C., MANN, M.J. & DZAU, V.J. (1998). Cell cycle progression: new therapeutic target for vascular proliferative disease. *Circulation*, **98**, 82–89.
- CAMPBELL, G.R. & CAMPBELL, J.H. (1990). The phenotypes of smooth muscle expressed in human atheroma. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **598**, 143–158.
- CHEN, D., KRASINSKI, K., CHEN, D., SYLVESTER, A., CHEN, J., NISEN, P.D. & ANDRÉS, V. (1997). Downregulation of cyclin-dependent kinase 2 activity and cyclin A promoter activity in vascular smooth muscle cells by p27<sup>Kip1</sup>, an inhibitor of neointima formation in the rat carotid artery. *J. Clin. Invest.*, **99**, 2334–2341.
- CILLERO, F.J., NAVARRO, J.L., NARVAIZA, J.T., PRIEGO, J.G. & ORTEGA, M.P. (1991). Clinical Pharmacology (Phase I) of PCA-4230, a new antithrombotic agent, in healthy volunteers. *Thromb. Haemost.*, **65**, 1145.
- DEL RIO, M., SUNKEL, C., LARCHER, F. & ORTEGA, M.P. (1997). Antiproliferative effects of PCA-4230, a new antithrombotic drug, in vascular smooth muscle cells. *Br. J. Pharmacol.*, **120**, 1360–1366.
- DYSON, N. (1998). The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev.*, **12**, 2245–2262.
- ELLEDGE, S.J. & HARPER, J.W. (1994). Cdk inhibitors: on the threshold of checkpoints and development. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **6**, 847–852.
- GIRARD, F., STRAUSFELD, U., FERNÁNDEZ, A. & LAMB, N. (1991). Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts. *Cell*, **67**, 1169–1179.
- GRAÑA, X. & REDDY, E.P. (1995). Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). *Oncogene*, **11**, 211–219.
- GUTIERREZ, DIAZ, J.A., TOLON, R.M., SUNKEL, C., PRIEGO, J.G. & ORTEGA, M.P. (1992). Interaction of platelets with subendothelium in rats treated with PCA-4230, a new antithrombotic agent. *Haemostasis*, **22**, 202–210.
- HELIN, K. & HARLOW, E. (1993). The retinoblastoma protein as a transcriptional repressor. *Trends Cell Biol.*, **3**, 43–46.
- HENGLEIN, B., CHENIVESSE, X., WANG, J., EICK, D. & BRÉCHOT, C. (1994). Structure and cell cycle-regulated transcription of the human cyclin A gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 5490–5494.
- HENTHORN, P., ZERVOS, P., RADUCHA, M., HARRIS, H. & KADESCH, T. (1988). Expression of a human placental alkaline phosphatase gene in transfected cells: use as a reporter for studies of gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**, 6342–6346.
- We thank M.P. Ortega/Laboratorios Alter (PCA-4230), C. Shanahan (E19P cells), J. Sobczak-Thépot (cyclin A-luciferase reporter gene), J.R. Nevins (Ad-E2F1, Ad-βgal) and K. Walsh (CMV-cyclin D1, CMV-E2F1) for the gift of reagents. We are also grateful to Dr Barbara A. Gilchrist for critical reading of the manuscript, and Maria J. Andrés for the preparation of figures. This work was supported by Spanish Dirección General de Educación Superior e Investigación Científica grant PM97-0136 and by National Institutes of Health grant HL ROI-57519 (to V. Andrés).
- HOLMES, D., FITZGERALD, P., GOLDBERG, S., LABLANCHE, J., LINCOFF, A.M., SAVAGE, M., SERRUYS, P.W., WILLERSON, J., GRANETT, J.R., CHAN, R., SHUSTERMAN, N.H. & POLAND, M. (2000). The PRESTO (Prevention of restenosis with tranilast and its outcomes) protocol: a double-blind, placebo-controlled trial. *Am. Heart J.*, **139**, 23–31.
- KEARNEY, M., PIECZEK, A., HALEY, L., LOSORDO, D.W., ANDRÉS, V., SCHAINFIELD, R., ROSENFELD, R. & ISNER, J.M. (1997). Histopathology of in-stent restenosis in patients with peripheral artery disease. *Circulation*, **95**, 1998–2002.
- LAVIA, P. & JANSEN-DURR, P. (1999). E2F target genes and cell-cycle checkpoint control. *Bioessays*, **21**, 221–230.
- LIBBY, P. & TANAKA, H. (1997). The molecular basis of restenosis. *Prog. Cardiovasc. Dis.*, **40**, 97–106.
- MANN, M.J., WHITTEMORE, A.D., DONALDSON, M.C., BELKIN, M., CONTE, M.S., POLAK, J.F., ORAV, E.J., EHSAN, A., DELL'ACQUA, G. & DZAU, V.J. (1999). Ex-vivo gene therapy of human vascular bypass grafts with E2F decoy: the PREVENT single-centre, randomised, controlled trial. *Lancet*, **354**, 1493–1498.
- MAYOL, X. & GRAÑA, X. (1998). The p130 pocket protein: keeping order at cell cycle exit/re-entrance transitions. *Front. Biosci.*, **3**, 11–24.
- MORGAN, D.O. (1995). Principles of CDK regulation. *Nature*, **374**, 131–134.
- NURSE, P. (1994). Ordering S phase and M phase in the cell cycle. *Cell*, **79**, 547–550.
- ORTEGA, M.P., SUNKEL, C., GÓMEZ, M.M., SANTOS, L., FAU DE CASA-JUANA, M. & PRIETO, J. (1993). A new generation of 1,4-dihydropyridines showing novel pharmacological properties. *Curr. Topics Med. Chem.*, **1**, 83–91.
- OWENS, G.K. (1995). Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol. Rev.*, **75**, 487–517.
- PAGANO, M., PEPPERKOK, R., VERDE, F., ANSORGE, W. & DRAETTA, G. (1992). Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *EMBO J.*, **11**, 961–971.
- PEREZ-ROGER, I., KIM, S.H., GRIFFITHS, B., SEWING, A. & LAND, H. (1999). Cyclins D1 and D2 mediate myc-induced proliferation via sequestration of p27(Kip1) and p21(Cip1). *EMBO J.*, **18**, 5310–5320.
- PETER, M. & HERSKOWITZ, I. (1994). Joining the complex: cyclin-dependent kinase inhibitory proteins and the cell cycle. *Cell*, **79**, 181–184.
- PICKERING, J.G., WEIR, L., ROSENFELD, K., STETZ, J., JEKANOWSKI, J., & ISNER, J.M. (1992). Smooth muscle cell outgrowth from human atherosclerotic plaque: implications for the assessment of lesion biology. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **20**, 1430–1439.
- RESNITZKY, D., HENGST, L. & REED, S.I. (1995). Cyclin A-associated kinase activity is rate limiting for entrance into S phase and is negatively regulated in G1 by p27<sup>Kip1</sup>. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 4347–4352.
- ROSENBERG, A.R., ZINDY, F., LE DEIST, F., MOULY, H., METEZEAU, P., BRÉCHOT, C. & LAMAS, E. (1995). Overexpression of human cyclin A advances entry into S phase. *Oncogene*, **10**, 1501–1509.



- ROSS, R. (1993). The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, **362**, 801–809.
- RUDOLPH, B., SAFFRICH, R., ZWICKER, J., HENGLEIN, B., MÜLLER, R., ANSORGE, W. & EILERS, M. (1996). Activation of cyclin-dependent kinases by Myc mediates induction of cyclin A, but not apoptosis. *EMBO J.*, **15**, 3065–3076.
- SCHULZE, A., ZERFASS, K., SPITKOVSKY, D., MIDDENDORP, S., BERGES, J., HELIN, K., JANSEN-DÜRR, P. & HENGLEIN, B. (1995). Cell cycle regulation of the cyclin A gene promoter is mediated by a variant E2F site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**, 11264–11268.
- SUNKEL, C.E., FAU DE CASA-JUANA, M., CILLERO, F.J., PRIEGO, J.G. & ORTEGA, M.P. (1988). Synthesis, platelet aggregation inhibitory activity, and in vivo antithrombotic activity of new 1,4-dihydropyridines. *J. Med. Chem.*, **31**, 1886–1890.
- SYLVESTER, A.M., CHEN, D., KRASINSKI, K. & ANDRÉS, V. (1998). Role of c-fos and E2F in the induction of cyclin A transcription and vascular smooth muscle cell proliferation. *J. Clin. Invest.*, **101**, 940–948.
- TAKAHASHI, A., TANIGUCHI, T., ISHIKAWA, Y. & YOKOYAMA, M. (1999). Tranilast inhibits vascular smooth muscle cell growth and intimal hyperplasia by induction of p21(waf1/cip1/sd1) and p53. *Circ. Res.*, **84**, 543–550.
- TAMAI, H., KATOH, O., SUZUKI, S., FUJII, K., AIZAWA, T., TAKASE, S., KUROGANE, H., NISHIKAWA, H., SONE, T., SAKAI, K. & SUZUKI, T. (1999). Impact of tranilast on restenosis after coronary angioplasty: tranilast restenosis following angioplasty trial (TREAT). *Am. Heart J.*, **138**, 968–975.
- WEI, G.L., KRASINSKI, K., KEARNEY, M., ISNER, J.M., WALSH, K. & ANDRÉS, V. (1997). Temporally and spatially coordinated expression of cell cycle regulatory factors after angioplasty. *Circ. Res.*, **80**, 418–426.
- WEINBERG, R.A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, **81**, 323–330.
- WEN, S.F., NODELMAN, M., NARED HOOD, K., DUNCAN, J., GERADTS, J. & SHEPARD, H.M. (1994). Retinoblastoma protein monoclonal antibodies with novel characteristics. *J. Immunol. Methods*, **169**, 231–240.
- ZERFASS-THOME, K., SCHULZE, A., ZWERSCHKE, W., VOGT, B., HELIN, K., BARTEK, J., HENGLEIN, B. & JANSEN-DÜRR, P. (1997). p27<sup>KIP1</sup> blocks cyclin E-dependent transactivation of cyclin A gene expression. *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 407–415.
- ZINDY, F., LAMAS, E., CHENIVESSE, X., SOBCZAK-THÉPOT, J., WANG, J., FESQUET, D., HENGLEIN, B. & BRÉCHOT, C. (1992). Cyclin A is required in S phase in normal epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **182**, 1144–1154.

(Received October 11, 2000

Revised January 10, 2001

Accepted January 11, 2001)



## TRABAJO 2

### **Role of E2F and ERK1/2 in STI571-mediated smooth muscle cell growth arrest and cyclin A transcriptional repression**

**Silvia M. Sanz-González**, Claudia Castro, Paloma Pérez and Vicente Andrés

**Biochemical and Biophysical Research Communications 317: 972-979 (2004)**

En este trabajo se incluyen los estudios llevados a cabo para cumplir con el **Objetivo 1** de esta Tesis Doctoral: Investigar los mecanismos moleculares responsables del efecto citostático que el fármaco STI571 ejerce sobre las CMLVs.

**RESUMEN:** Un evento clave durante la enfermedad vascular obstructiva es la proliferación excesiva de CMLVs. Se ha demostrado que el factor de crecimiento PDGF-BB es un potente mitógeno de CMLVs. Trabajos previos han demostrado que el inhibidor de tirosín quinasa del receptor de PDGF-BB, STI571, atenúa la proliferación de CMLVs y el engrosamiento de la neoíntima en modelos animales. Nuestro objetivo ha sido investigar los mecanismos moleculares responsables del efecto antiproliferativo del STI571 en CMLVs en cultivo. Demostramos que el tratamiento con este fármaco inhibe la expresión de ciclina D1 y ciclina A observada en CMLVs re-estimuladas con PDGF-BB. También demostramos una inhibición de la actividad del promotor de la ciclina A en presencia de STI571, efecto que requiere un sitio de unión E2F funcional. Además, el STI571 inhibe la actividad de unión a ADN de E2F y la expresión ectópica de E2F previene el efecto inhibitorio de STI571 sobre la transcripción de ciclina A. Demostramos también que STI571 bloquea la activación de las ERK1/2 inducida por PDGF-BB, y que la activación forzada de estas quinasas impide el efecto inhibitorio de STI571 sobre la transcripción de la ciclina A y la proliferación de CMLVs. En conclusión, la represión de las quinasas ERK1/2 y del factor E2F juega un papel clave en la parada de ciclo celular de CMLVs inducida por STI571, así como en la represión transcripcional que ejerce este fármaco sobre la ciclina A. Estos resultados pueden ser importantes en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de la hiperplasia de la neoíntima.





## Role of E2F and ERK1/2 in STI571-mediated smooth muscle cell growth arrest and cyclin A transcriptional repression

Silvia M. Sanz-González,<sup>a,b</sup> Claudia Castro,<sup>a,b</sup> Paloma Pérez,<sup>a,b</sup> and Vicente Andrés<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> *Laboratory of Vascular Biology, Department of Molecular and Cellular Pathology and Therapy, Instituto de Biomedicina de Valencia, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Valencia, Spain*

<sup>b</sup> *Hormone Action Laboratory, Department of Molecular and Cellular Pathology and Therapy, Instituto de Biomedicina de Valencia, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Valencia, Spain*

Received 9 January 2004

### Abstract

Platelet-derived growth factor (PDGF) ligand and receptors (PDGF-R) activate smooth muscle cell (SMC) proliferation, a key event during vascular obstructive disease. The PDGF-R tyrosine kinase inhibitor STI571 attenuates SMC proliferation and experimental neointimal thickening. Here, we investigated the molecular mechanisms underlying STI571-dependent SMC growth arrest. STI571 abrogates PDGF-BB-dependent cyclin D1 and cyclin A protein expression and inhibits transcriptional activation of reporter genes driven by the human cyclin A gene promoter. Repression of cyclin A promoter activity by STI571 requires a functional E2F-binding site, and forced expression of E2F overrides this inhibitory effect. Moreover, STI571 inhibits E2F DNA-binding activity in SMCs. We also found that STI571 abrogates PDGF-BB-dependent activation of extracellular-regulated kinase 1 and 2 (ERK1/2), and forced activation of these factors impaired STI571-dependent inhibition of both cyclin A promoter activity and SMC proliferation. Thus, E2F and ERK1/2 play an important role in STI571-mediated SMC growth arrest and cyclin A transcriptional repression. These findings may have importance in the development of novel therapeutic strategies for the treatment of neointimal hyperplasia.

© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** STI571; Smooth muscle cell; Cyclin A; ERK; E2F

Atherosclerosis and associated diseases are the main causes of morbidity and mortality in developed countries. Abnormal smooth muscle cell (SMC) proliferation and migration have been implicated in neointimal lesion growth during the pathogenesis of atherosclerosis and restenosis after angioplasty, a complication that limits the long-term efficacy of this revascularization procedure [1–3]. Several growth regulatory factors have been involved in both atherosclerotic and restenotic lesion formation, including platelet-derived growth factor (PDGF), basic fibroblast growth factor, tumor necrosis factor- $\alpha$ , insulin-like growth factor-1, heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor, interleukin-1, and transforming growth factor- $\beta$  [1–5].

In vitro studies have established that PDGF acts as a potent mitogen and chemoattractant for SMCs [6–8]. Moreover, PDGF has been involved in the transformation of SMCs from the contractile (quiescent) to the synthetic (proliferative) phenotype characteristic of neointimal lesions [6,9]. Both PDGF-BB and its receptor PDGF-R $\beta$  are expressed in neointimal lesions of experimental animals and humans [10–14]. Importantly, neutralizing antibodies directed against PDGF [15], or attenuation of PDGF-R $\beta$  subunit expression [16], inhibited neointimal hyperplasia in balloon-injured arteries. In contrast, recombinant PDGF B gene expression in porcine arteries induces intimal hyperplasia in vivo [17].

PDGF-R $\beta$  binds PDGF-BB with high affinity, PDGF-AB with low affinity, but does not bind PDGF-AA [18]. Dimerization of PDGF-R $\beta$  occurs after ligand binding and is closely associated with activation of the receptor protein tyrosine kinase (PTK). This leads to

\* Corresponding author. Fax: +34-96-339-1750.  
E-mail address: [vandres@ibv.csic.es](mailto:vandres@ibv.csic.es) (V. Andrés).

autophosphorylation of specific tyrosine residues within the intracellular domain of PDGF-R $\beta$  and activation of downstream signal transduction pathways involved in cell proliferation and chemotaxis. Importantly, PTK inhibitors attenuate both SMC growth and chemotaxis [19–21]. STI571 (also named Gleevec, Imatinib, and CGP57148B) is a low molecular weight inhibitor of the PTK activity of both PDGF-R subtypes [22,23], as well as that of Abl [24], Bcr-Abl [25,26], and c-kit [23,24, 27,28]. STI571 is currently being used clinically with great success to treat several forms of malignancies, in particular chronic myelogenous leukemia (reviewed in [29,30]). The therapeutic efficacy of STI571 has been also demonstrated in animal models of vascular proliferative disease, including restenosis after balloon angioplasty [31], diet-induced atherosclerosis [32], and transplant atherosclerosis [33]. Recently, oral STI571 has been shown to improve the efficacy of local intravascular endothelial growth factor-C gene transfer in reducing neointimal growth in hypercholesterolemic rabbits [34]. Furthermore, STI571 completely inhibits *in vitro* angiogenesis in fibrinogen-embedded mouse aorta [35]. To gain insight into the molecular mechanisms underlying STI571-dependent effects on the vasculature, we examined here the effects of this drug on the expression and activity of signal transduction and cell cycle regulatory factors in SMCs.

## Materials and methods

**Cell culture.** Rat embryonic aorta E19P cells (gift from C. Shanahan, University of Cambridge, Cambridge, UK) and primary SMCs from adult rat aorta were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal serum bovine (FBS), 100 U/mL penicillin, 0.1 mg/mL streptomycin, and 2 mmol/L L-glutamine (Life Technologies). The latter were prepared by digesting with collagenase (Worthington) the aorta of adult Wistar rats. Arteries were dissected free from surrounding tissue and adventitia. Tissue was cut into small pieces and digested in collagenase media supplemented with 10% FBS for 4 h in a shaking bath at 37 °C. Cells were used between passage 2 and 14. Preparation of primary cultures of rabbit femoral artery SMCs (FSMCs) and retroviral infection with control pBabePuro-LacZ (FSMC-LacZ) and pBabePuro-MEKE (pBabePuro-MEKE), which encodes for a constitutively active MEK1 mutant [36], were carried out as previously described [37]. Cultures were maintained at 37 °C in a humidified 5% CO<sub>2</sub>–95% O<sub>2</sub> atmosphere.

**Effect of STI571 on SMC proliferation.** STI571 was provided by Novartis Pharma AG (Basel, Switzerland). Both solid and stock solution of STI571 (10 mM in 0.9% NaCl) were stored at –20 °C. Rat SMCs for [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation assays were seeded in 12-well plates (Sarstedt) at a density of 5 × 10<sup>3</sup> cells/well in 10% FBS/DMEM. To render the cells quiescent, the next morning cultures were switched to mitogen-free insulin-transferrin-selenium media supplemented with 250 μM ascorbic acid and 10<sup>–11</sup> M FeCl<sub>3</sub> (ITC media, Life Technology) [38] and maintained for 48 h under these conditions. Control cultures were stimulated with 10 ng/mL PDGF-BB (Sigma–Aldrich) to induce cell cycle reentry. For STI571 treatment, starvation-synchronized cells were treated with this drug during the last 12 h and throughout the period of mitogen stimulation. Cells were pulsed with 1 mCi/L [<sup>3</sup>H]thymidine (Amersham) during the last 12 h of stimulation. After

washes with phosphate buffered saline (PBS), cells were lysed with 1% sodium dodecyl sulphate (SDS) and then DNA was precipitated with 15% trichloroacetic acid (TCA). This solution was filtered through Whatman GF/C 2.5 cm glass fibre (Afora) and washed with 5% TCA. After a wash with 100% ethanol, filters were dried and placed in scintillation vials. The radioactivity incorporated into DNA was measured in a 1414 liquid scintillation counter (Wallac) after addition of 5–6 mL Optiphase 'HISAFE'3 scintillation fluid (Wallac).

Asynchronously growing rabbit FSMCs were plated in 10% FBS/DMEM-F12 at a density of 40 × 10<sup>3</sup> cells/well in 12-well plates. Once cells were firmly attached (6–8 h later), the medium was removed and cells were washed with PBS before stimulation for 24 h with 10 ng/mL PDGF-BB in the presence of increasing doses of STI571 (0, 0.5, 2, and 5 μM). Cells were pulsed with 1 mCi/L [<sup>3</sup>H]thymidine during the last 4 h of stimulation and radioactivity incorporated into DNA was measured as indicated above.

**Western blot analysis.** Cultures were rendered quiescent by serum starvation in mitogen-free ITC media during 48 h and then stimulated with 10 ng/mL PDGF-BB in the presence or absence of 5 μM STI571 (which was added to the cells 10–12 h prior to PDGF-BB stimulation). Cell lysates were prepared in either ice-cold lysis buffer A or buffer B supplemented with protease inhibitor Complete Mini cocktail (Roche Diagnostics). Lysis in buffer A (50 mM Hepes, pH 7.5, 150 mM NaCl, 2.5 mM EGTA, 10 mM β-glycerophosphate, 10% glycerol, 0.1% Tween 20, 0.1 mM NaVO<sub>3</sub>, and 1 mM DTT) consisted in three cycles of freezing in liquid nitrogen and thawing at 37 °C and vortexing. Lysates were centrifuged at maximum speed for 10 min at 4 °C in a 5417R microfuge (Eppendorf). Lysis in buffer B (0.5% Triton X-100, 0.5% deoxycholate, 20 mM Tris–HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 10 mM β-glycerophosphate, 0.1 mM NaVO<sub>3</sub>, and 1 mM DTT) was carried out by 20 min incubation at 4 °C and then lysates were centrifuged at 10,000g for 15 min at 4 °C. The protein concentration in the supernatants was determined by the Bradford assay (Bio-Rad). Protein samples (40 μg) were separated onto 7–12% SDS–polyacrylamide gels for Western blot analysis. The following antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology: cyclin D1 (SC-450 1:500), cyclin A (SC-751 1:250), α-tubulin (SC-8035, 1:200), CDK2 (SC-163-G, 1:200), PDGFR-β (SC-432, 1:250), p-ERK1/2 (SC-7383, reactive with Tyr-204 phosphorylated ERK1 and ERK2, 1:200). Antibodies against ERK1/2 (06-182, reactive with ERK1/2, 1:200) and phospho-Tyr (05-321, 1:500) were purchased from Upstate Biotechnology.

**Electrophoretic mobility shift assays (EMSA).** Cell extracts were prepared in buffer C (25% glycerol, 20 mM Hepes, pH 7.9, 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 3 μg/mL leupeptin, 3 μg/mL aprotinin) as indicated above for buffer A. Lysates were centrifuged at 10,000g for 20 min at 4 °C and protein concentration was determined using the Bradford assay. EMSA was performed with a radiolabeled double-stranded E2F consensus oligonucleotide (SC-2507, Santa Cruz Biotechnology). Binding reactions were carried out as described [39] using 15 μg cell lysate. Competition experiments were carried out in the presence of a 50-fold molar excess of unlabeled wild-type or mutant (SC-2508, Santa Cruz Biotechnology) E2F oligonucleotides.

**Transient transfection and luciferase assays.** E19P cells were seeded at 5 × 10<sup>3</sup> cells/mL onto six-well plates (Sarstedt) 8–10 h before transfection. The luciferase reporter plasmids driven by the human cyclin A promoter region from –924/+245 (wild type and CRE mutant) and –79/+100 (wild type and E2F mutant) have been previously described [40–42]. To investigate the effect of STI571 on cyclin A promoter activity (Fig. 3), transient transfection was carried out according to the manufacturer's instructions using mixtures containing 2 μg of reporter plasmid and 6 μl of FuGene 6 transfection reagent (Roche Diagnostics). After 15 h, cells were washed with PBS and switched to 10 ng/mL PDGF-BB in the presence or absence of 5 μM STI571. After 26 h, cell lysates were prepared for luciferase activity assay according to the recommendation of the manufacturer (Luciferase Reporter Gene Assay high sensitivity, Roche Diagnostics). For

each sample, luciferase was normalized for protein concentration. Results represent means  $\pm$  SE of 12 independent transfections.

To investigate the effect of forced activation of ERK1/2 (Fig. 6), FSMC-LacZ and FSMC-MEKE cells were incubated with transfection mixtures containing the human cyclin A promoter region from  $-924/+245$  (wild-type) prepared as indicated above for E19P cells. After 15 h, cells were trypsinized, pooled, and reseeded on six-well plates. Once cells were firmly attached (approximately 8 h later), cultures were switched to 10 ng/mL PDGF-BB in the presence or absence of 5  $\mu$ M STI571. Luciferase activity was determined as indicated above for E19P cells. Results represent means  $\pm$  SE of six independent assays.

To investigate the effect of forced E2F1 expression (Fig. 4), E19P cells were incubated with transfection mixtures containing 1.5  $\mu$ g of the human cyclin A promoter region from  $-79/+100$  (wild-type), 0.5  $\mu$ g of empty pCMV-NeoBam vector or 0.5  $\mu$ g pRc-CMV-HA-E2F1 (gift from M. Campanero), and 50 ng pRL-TK (Promega). Firefly (from cyclin A reporter) and *Renilla* (from pRL-TK) luciferase activities were determined in each lysate according to the manufacturer's instructions (Dual-Glo Luciferase Assay System, Promega) and cyclin A promoter activity was calculated as the firefly/*Renilla* luciferase ratio. Results represent means  $\pm$  SE of three independent assays.

**Statistical analysis.** Results are reported as means  $\pm$  SE. Differences were evaluated using either a 2-tail, unpaired *t* test or ANOVA and Fisher's post hoc test (Statview, SAS institute).

## Results

### STI571 inhibits PDGF-BB-stimulated SMC proliferation

Primary cultures of rat aorta SMCs were rendered quiescent by maintaining the cultures for 48 h in mitogen-free ITC media. To induce synchronous cell cycle reentry, starved cultures were stimulated with 10 ng/mL PDGF-BB in the presence or in the absence of STI571. As expected, STI571 completely abolished the rapid induction of PDGF-R $\beta$  tyrosine phosphorylation elicited by its ligand PDGF-BB (Fig. 1A). STI571 inhibited in a dose-dependent manner cell cycle progression induced by PDGF-BB, as determined by [ $^3$ H]thymidine incorporation assays (Fig. 1B).

### Effect of STI571 on the expression of cell cycle regulatory proteins

To gain insight into the mechanisms underlying the inhibition of SMC proliferation by STI571, we examined the effect of this drug on the expression of cell cycle regulatory proteins required for progression through the G1/S phase of the cell cycle. As shown by the representative Western blot analysis of Fig. 2, stimulation of starvation-synchronized primary SMCs with PDGF-BB resulted in a transient induction of cyclin D1 (with a maximum peak between 6 and 12 h) followed by the upregulation of cyclin A (with maximal expression between 18 and 24 h). Treatment with STI571 abolished PDGF-BB-dependent induction of cyclin D1 and cyclin A, and reduced CDK2 expression from 12 to 24 h. In contrast,  $\alpha$ -tubulin was expressed at similar level in all experimental conditions tested.

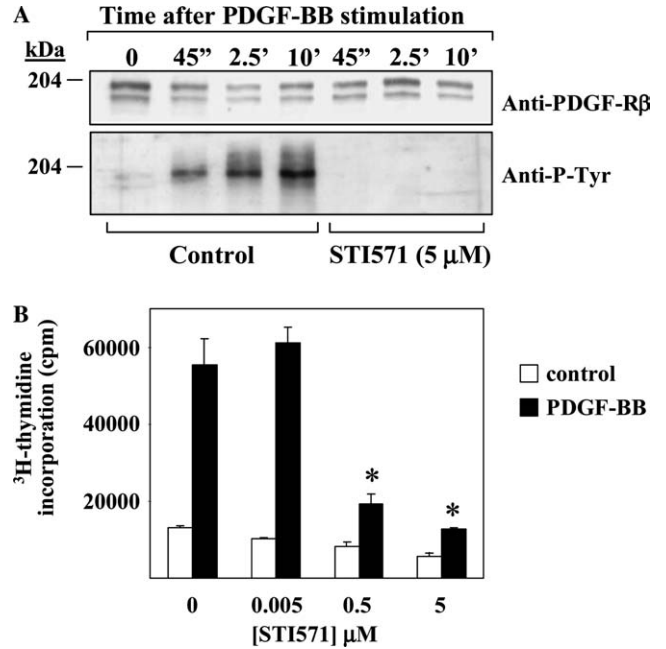


Fig. 1. The PDGF-R PTK inhibitor STI571 blocks PDGF-BB-dependent autophosphorylation of PDGF-R and attenuates SMC proliferation in a dose-dependent manner. Serum-starved primary rat SMCs were restimulated with PDGF-BB in the presence or in the absence of STI571. (A) Western blot analysis using anti-PDGF-R $\beta$  and anti-p-Tyr antibodies. Cell extracts were prepared in lysis buffer B. STI571 inhibits the rapid autophosphorylation of PDGF-R $\beta$  in Tyr without affecting its level of expression. (B) [ $^3$ H]Thymidine incorporation assay in serum-starved cells and in cultures re-stimulated for 24 h with PDGF-BB. Cells were incubated with [ $^3$ H]thymidine during the last 12 h of PDGF-BB stimulation. Results represent means  $\pm$  SE of three assays. Statistical analysis was performed using ANOVA and Fisher's post hoc test. For simplicity, only comparisons among PDGF-BB-treated cells are shown: \* $p < 0.0001$  versus PDGF-BB-induced in the absence of STI571.

### STI571 inhibits PDGF-BB-stimulated human cyclin A promoter activity by a mechanism involving the transcription factor E2F

Having demonstrated the blockade of PDGF-BB-induced cyclin A protein expression in SMCs treated with STI571, we next sought to examine whether repression of cyclin A promoter activity may contribute to the inhibitory effect of this drug. To this end, E19P cells were transiently transfected with luciferase reporter genes driven by different regions of the human cyclin A promoter (Fig. 3). Activity of the fragment from  $-924$  to  $+245$  relative to the transcription initiation site was inhibited by 83% in the presence of STI571 ( $p < 0.0001$  versus control,  $n = 12$ ). Mutation of the CRE *cis*-element within the context of the  $-924/+245$  promoter region (CRE Mut) reduced the inhibitory effect of STI571 (48% inhibition versus control cells,  $p < 0.0001$ ,  $n = 12$ ). Likewise, STI571 inhibited by 54% the promoter activity of a construct encompassing the cyclin A  $-79/+100$  wild-type sequence ( $p < 0.0001$  versus control,  $n = 12$ ).

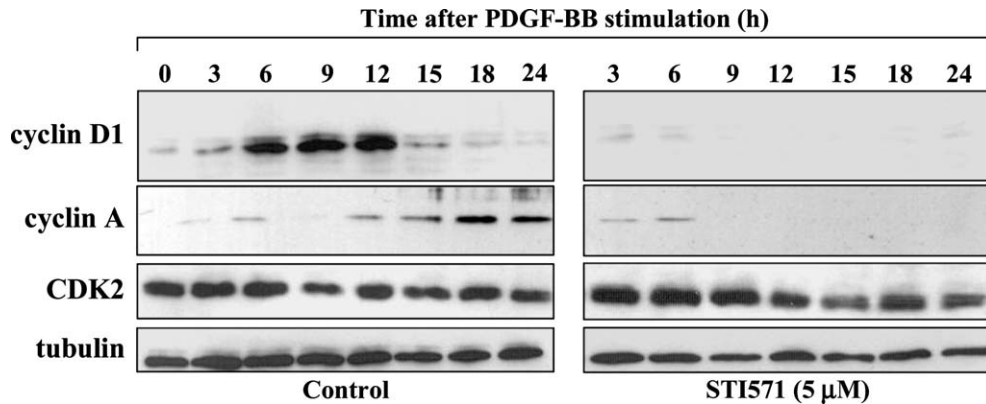


Fig. 2. STI571 abolishes PDGF-BB-induced upregulation of cyclin D1 and cyclin A. Rat primary SMCs were maintained for 48 h in mitogen-free ITC media and then exposed to PDGF-BB for the indicated time in the presence or absence of 5 μM STI571. Cell lysates were prepared in buffer A for Western blot analysis of cell cycle regulatory proteins. Similar results as those shown in this figure were obtained in independent experiments.

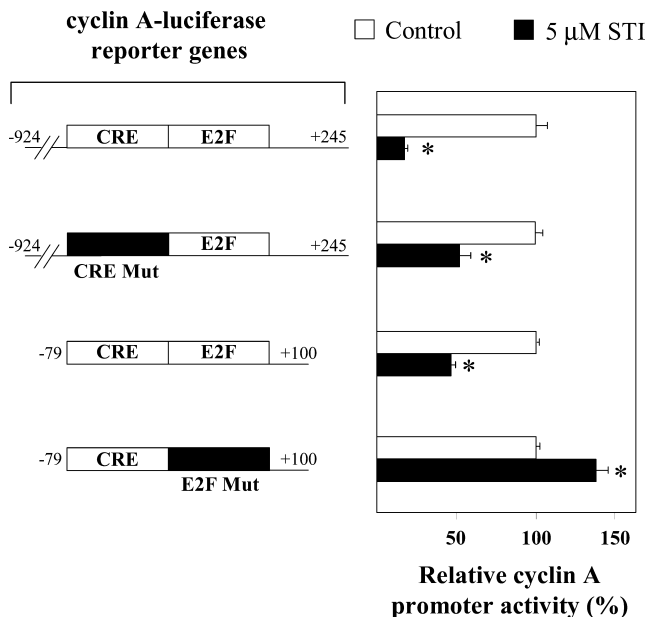


Fig. 3. STI571 inhibit human cyclin A promoter activity. E19P cells transiently transfected with luciferase reporter genes driven by different regions of the human cyclin A promoter were stimulated for 26 h with 10 ng/mL PDGF-BB in the presence or absence of 5 μM STI571. For each reporter gene, activity in the presence of STI571 is represented relative to control (=100%). Results represent means ± SE of 12 independent assays. The asterisk indicates  $p < 0.0001$  versus control, as determined by 2-tail, unpaired  $t$  test. CRE Mut and E2F Mut: reporters with CRE and E2F sites mutated, respectively.

We also found that mutations that render the E2F site inactive in the context of the -79/+100 construct (cyclin A -79/+100 E2F Mut) abrogated the inhibitory effect of STI571 (promoter activity of 138% versus control,  $p < 0.0001$ ,  $n = 12$ ). Further evidence implicating E2F as a target of STI571 was provided in rescue experiments using an E2F1 expression vector, which abolished STI571-dependent inhibition of the cyclin A -79/+100 reporter gene (Fig. 4A). We also performed EMSAs using a radiolabeled E2F consensus target. As shown in

Fig. 4B, these studies revealed the existence of a nucleoprotein complex that was inhibited by STI57 in PDGF-BB-stimulated E19P cells and was competed away by an excess of wild-type (Wt) but not mutated (Mut) E2F oligonucleotide. In contrast, STI571 did not inhibit CRE-dependent DNA-binding activity (data not shown).

#### *Forced activation of ERK1/2 in SMCs impairs the inhibitory effect of STI571 on cyclin A promoter activity and cell proliferation*

Because the MAPK pathway plays a pivotal role in transducing environmental cues required for both cell proliferation and migration [43], we investigated the effect of STI571 on the activation of the MAPK isoforms of 44 and 42 kDa (named ERK1 and ERK2, respectively) triggered by PDGF-BB addition to starvation-synchronized SMCs. As shown by the representative Western blot analysis of Fig. 5, STI571 severely inhibited the rapid and transient phosphorylation of ERK1/2 induced by PDGF-BB without affecting total ERK1/2 protein level.

In order to assess whether ERK1/2 inhibition plays an important role in STI571-dependent inhibitory effects in SMCs, we carried out gain-of-function experiments using a retroviral vector that directs the expression of a constitutively active mutant of MEK1. We have recently shown that infection of rabbit FSMCs with this retrovirus leads to constitutive phosphorylation of ERK1/2 [37]. STI571 significantly inhibited PDGF-BB-dependent activity of the -924/+245 cyclin A promoter region in FSMCs infected with control retrovirus (Fig. 6A, FSMC-LacZ), although to a lesser extent than in E19P cells (confer Fig. 3). Of note, STI571 failed to inhibit the activity of the -924/+245 cyclin A promoter in FSMCs infected with the retrovirus encoding for the constitutively active MEK1 mutant (Fig. 6A, FSMC-MEKE). Likewise, the efficacy of STI571 as a growth suppressor



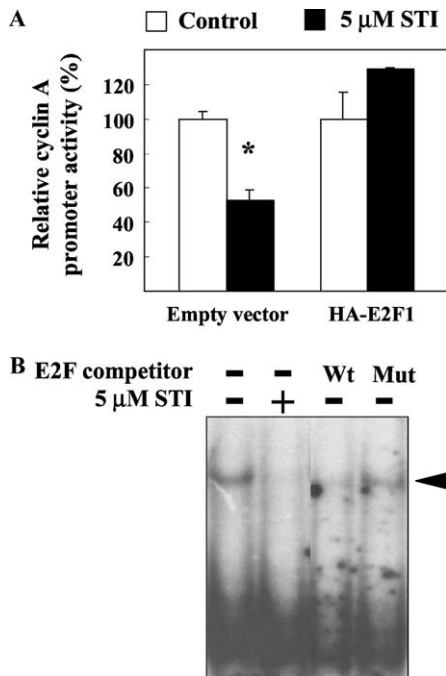


Fig. 4. Role of E2F in STI571-dependent inhibition of cyclin A promoter activity. (A) E19P cells transiently cotransfected with a luciferase reporter gene driven by the human cyclin A promoter region -79/+100 (wild-type), pRL-TK, and either control pCMV-NeoBam (Empty vector) or pRC-CMV-HA-E2F1 (HA-E2F1) were stimulated for 26 h with 10 ng/mL PDGF-BB in the presence or absence of 5 μM STI571. For each experimental condition, activity in the presence of STI571 is represented relative to control without STI571 (=100%). Results represent means ± SE of three independent assays. The asterisk indicates  $p < 0.003$  versus control, as determined by 2-tail, unpaired  $t$  test. (B) Extracts were prepared from starvation-synchronized E19P cells restimulated for 12 h with 10 ng/mL PDGF-BB in the presence or absence of 5 μM STI571. EMSA was performed using 15 μg of cell extract and a radiolabeled E2F consensus target. Competition experiments were carried out by preincubating cell extracts with a 50-fold molar excess of unlabeled E2F oligonucleotide (Wt, wild-type; Mut, E2F site mutated) prior to addition of the probe. Only retarded bands are shown. The arrow indicates a nucleoprotein complex inhibited by STI571 and competed away by Wt but not Mut oligonucleotide.

was reduced in FSMC-MEKE compared with FSMC-LacZ cultures (Fig. 6B). For instance, 0.5 μM STI571 significantly reduced proliferation of FSMC-LacZ but not FSMC-MEKE cells. At higher concentrations, STI571 significantly inhibited the proliferation of both FSMC-LacZ and FSMC-MEKE, although the potency of the drug was comparatively reduced in the latter.

**Discussion**

In addition to the beneficial therapeutic effects of the 2-phenylaminopyrimidine derivative STI571 on chronic myelogenous leukemia in humans [29,30], the therapeutic efficacy of this PTK inhibitor has been also demonstrated in animal models of vascular proliferative

disease, including restenosis after balloon angioplasty [31], diet-induced atherosclerosis [32], and transplant atherosclerosis [33]. CGP 53716, another PTK inhibitor of the 2-phenylaminopyrimidine class, also attenuated neointimal thickening in a rat carotid artery model of balloon angioplasty [44], and prevented cardiac allograft arteriosclerosis [45]. However, the molecular mechanisms by which PTK inhibitors exert these therapeutic effects are poorly understood. In this study, we have examined in cultured SMCs the effect of STI571 on key cell cycle regulators and signal transduction factors involved in cell growth and migration. We found that STI571 inhibits PDGF-BB-induced SMC growth (Fig. 1B) and migration (data not shown). Of note, STI571 has been shown to inhibit in vitro angiogenesis, and this angiostatic effect was attributed mainly to an antiproliferative and antimigratory action on SMCs [35]. Likewise, CGP 53716 has been shown to selectively inhibit PDGF-R autophosphorylation leading to impaired PDGF-dependent c-fos mRNA upregulation and diminished SMC proliferation and migration in vitro [22].

In order to explore the molecular mechanisms underlying the antiproliferative effect of STI571 on SMCs, we investigated the effect of this drug on cell cycle and signal transduction molecules implicated in cell proliferation. We found that STI571 inhibits PDGF-BB-induced ERK1/2 activation, a key process in PDGF-dependent stimulation of cell growth [43]. Moreover, treatment with STI571 fully prevented the upregulation of cyclin D1 and cyclin A normally seen in PDGF-BB-stimulated SMCs. Our transient transfection experiments suggest that the inhibitory effect of STI571 on cyclin A protein expression is mediated, at least in part, by transcriptional repression of the cyclin A gene promoter. Previous studies have documented the binding of CREB/ATF and E2F factors to the human cyclin A promoter elements located at position -79/-72 and -37/-32, respectively [40,42,46–48]. We show here that STI571 reduces E2F DNA-binding activity. Moreover, mutations that disrupted the cyclin A -37/-32 E2F-binding site abrogated STI571-dependent cyclin A transcriptional repression, and ectopic overexpression of E2F fully overrode this inhibitory effect. Thus, E2F is a critical target of STI571 in SMCs. Regarding the involvement of the cyclin A -79/-72 CRE/ATF site, our results show that this *cis*-element is necessary for maximum inhibition by STI571 in the context of the -924/+245 promoter region. However, our EMSAs indicate that this drug does not prevent PDGF-BB-mediated induction of binding of cellular proteins to the cyclin A -79/-72 CRE/ATF site (data not show). Additional studies are thus required to elucidate the mechanism(s) underlying the requirement of this CRE/ATF site for efficient STI571-dependent inhibition of cyclin A promoter activity. Likewise, further experiments are necessary to identify the *cis*-element(s) located within -924

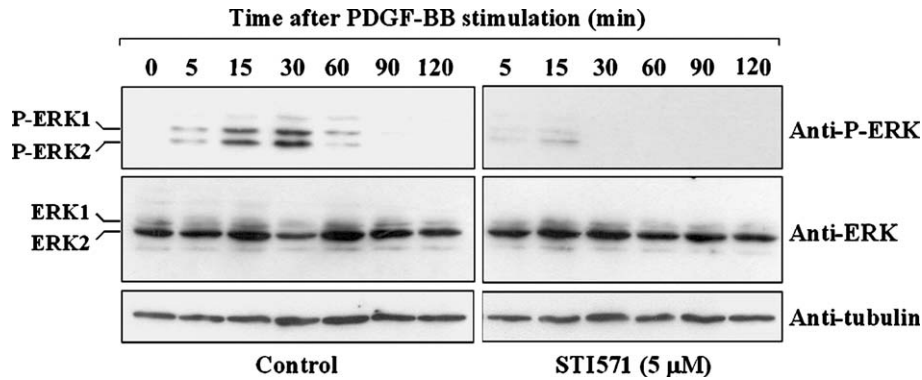


Fig. 5. STI571 inhibits PDGF-BB-induced phosphorylation of ERK1 and ERK2 in rat SMCs. Western blot analysis of serum-starved rat primary SMCs restimulated with 10 ng/mL PDGF-BB for the indicated times in the presence or in the absence of 5  $\mu$ M STI571. Cell lysates were prepared in buffer A. STI571 inhibits the phosphorylation (activation) of ERK1/2 (Anti-P-ERK), without affecting total protein expression (Anti-ERK). Tubulin is shown as a loading control (Anti-tubulin). Similar results as those shown in this figure were obtained in independent experiments.

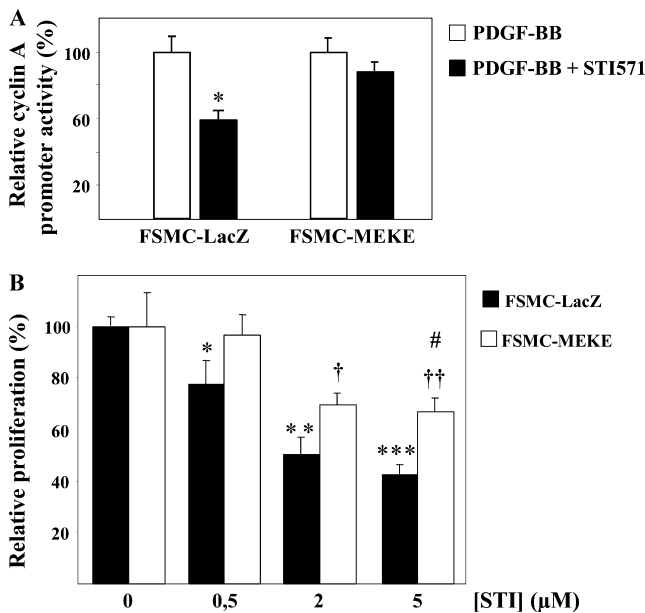


Fig. 6. Forced activation of MAPKs in SMCs impairs the inhibitory effect of STI571 on both cyclin A promoter activity and cell proliferation. Rabbit FSMCs were infected with retroviral vectors encoding a constitutively active MEK1 mutant (FSMC-MEKE) or LacZ for control (FSMC-LacZ). (A) Cells transiently transfected with a luciferase reporter gene driven by the human cyclin A promoter region  $-924/+245$  were stimulated for 26 h with 10 ng/ml PDGF-BB in the presence or in the absence of 5  $\mu$ M STI571. Results represent means  $\pm$  SE of six assays. Activity in the presence of STI571 is represented relative to its corresponding control (= 100%). The asterisk indicates  $p < 0.002$  versus control, as determined by 2-tail, unpaired  $t$  test. (B) [ $^3$ H]Thymidine incorporation assay of cells asynchronously growing in the presence of PDGF-BB, with or without STI571. Results represent means  $\pm$  SE of three independent assays. For each retroviral infection, [ $^3$ H]thymidine incorporation in the presence of STI571 is represented relative to control (= 100%). Statistical analysis was performed using ANOVA and Fisher's post hoc test. Comparisons versus untreated FSMC-LacZ: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.0002$ ; and \*\*\* $p < 0.0001$ . Comparisons versus untreated FSMC-MEKE: † $p < 0.002$ ; †† $p < 0.007$ . Comparisons between FSMC-LacZ and FSMC-MEKE at each dose of STI571: # $p < 0.05$ .

and  $-80$  that are necessary for maximum inhibition of the  $-924/+245$  cyclin A promoter.

To assess whether inhibition of ERK1/2 by STI571 contributes to reduced cyclin A promoter activity, we transfected the  $-924/+245$  cyclin A reporter into rabbit FSMCs infected with a retroviral vector that encodes for a constitutively active MEK1 mutant that induces constitutive activation of ERK1/2 [37]. We found that STI571-induced repression of cyclin A promoter activity is attenuated in FSMC-MEKE compared to control FSMC-LacZ. Moreover, forced activation of ERK1/2 prevented growth arrest induced by 0.5  $\mu$ M STI571 and reduced the growth suppressive effect at higher doses of STI571.

In summary, our studies suggest that ERK1/2 inactivation and blockade of cyclin D1 and cyclin A up-regulation play a critical role in STI571-mediated inhibition of PDGF-BB-induced SMC proliferation. Consistent with this notion, forced activation of ERK1/2 in SMCs impaired the inhibitory effect of STI571 on both PDGF-BB-induced cyclin A promoter activity and cell proliferation. Our results also demonstrate that E2F is a critical target of STI571 in SMCs. Gene expression profiling studies comparing untreated and STI571-treated SMCs and gain and loss-of-function experiments are warranted to identify additional regulatory factors implicated in the antiproliferative properties of this drug.

## Acknowledgments

We thank Novartis Pharma AG (Basel, Switzerland) for providing STI571, M.J. Andrés-Manzano for preparing the figures, and C. Shanahan (Cambridge, UK) and M. Campanero (Madrid, Spain) for the gift of E19P cells and pRc-CMV-HA-E2F1, respectively. Work in the laboratory of V.A. is supported in part by grants from the Ministerio de Ciencia y Tecnología of Spain and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (SAF2001-2358, SAF2002-1443), from Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) (Red de Centros C03/01), and from

Genera-litat Valenciana (GRUPOS03/072). S.M.S.-G. is a research fellow of the ISCIII. C.C. has been supported by research fellowships from the Agencia Española de Cooperación Internacional and from the ISCIII.

## References

- [1] P. Libby, H. Tanaka, The molecular basis of restenosis, *Prog. Cardiovasc. Dis.* 40 (1997) 97–106.
- [2] R. Ross, Atherosclerosis: an inflammatory disease, *N. Engl. J. Med.* 340 (1999) 115–126.
- [3] A.J. Lusis, Atherosclerosis, *Nature* 407 (2000) 233–241.
- [4] B. Cercek, B. Sharifi, P. Barath, L. Bailey, J.S. Forrester, Growth factors in pathogenesis of coronary arterial restenosis, *Am. J. Cardiol.* 68 (1991) 24C–33C.
- [5] V. Andrés, Control of vascular smooth muscle cell growth and its implication in atherosclerosis and restenosis, *Int. J. Mol. Med.* 2 (1998) 81–89.
- [6] G.R. Grotendorst, T. Chang, H.E. Seppa, H.K. Kleinman, G.R. Martin, Platelet-derived growth factor is a chemoattractant for vascular smooth muscle cells, *J. Cell. Physiol.* 113 (1982) 261–266.
- [7] K.E. Bornfeldt, E.W. Raines, T. Nakano, L.M. Graves, E.G. Krebs, R. Ross, Insulin-like growth factor-I and platelet-derived growth factor-BB induce directed migration of human arterial smooth muscle cells via signaling pathways that are distinct from those of proliferation, *J. Clin. Invest.* 93 (1994) 1266–1274.
- [8] R. Ross, E.W. Raines, D.F. Bowen-Pope, The biology of platelet-derived growth factor, *Cell* 46 (1986) 155–169.
- [9] R.S. Blank, G.K. Owens, Platelet-derived growth factor regulates actin isoform expression and growth state in cultured rat aortic smooth muscle cells, *J. Cell. Physiol.* 142 (1990) 635–642.
- [10] R. Ross, J. Masuda, E.W. Raines, A.M. Gown, S. Katsuda, M. Sasahara, L.T. Malden, H. Masuko, H. Sato, Localization of PDGF-B protein in macrophages in all phases of atherogenesis, *Science* 248 (1990) 1009–1012.
- [11] N.A. Scott, G.D. Cipolla, C.E. Ross, B. Dunn, F.H. Martin, L. Simonet, J.N. Wilcox, Identification of a potential role for the adventitia in vascular lesion formation after balloon overstretch injury of porcine coronary arteries, *Circulation* 93 (1996) 2178–2187.
- [12] M.W. Majesky, M.A. Reidy, D.F. Bowen-Pope, C.E. Hart, J.N. Wilcox, S.M. Schwartz, PDGF ligand and receptor gene expression during repair of arterial injury, *J. Cell Biol.* 111 (1990) 2149–2158.
- [13] D. Gordon, Growth factors and cell proliferation in human transplant arteriosclerosis, *J. Heart Lung Transplant.* 11 (1992) S7.
- [14] J. Waltenberger, M.L. Akyurek, M. Aurivillius, A. Wanders, E. Larsson, B. Fellstrom, K. Funai, Ischemia-induced transplant arteriosclerosis in the rat. Induction of peptide growth factor expression, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16 (1996) 1516–1523.
- [15] G.A. Ferns, E.W. Raines, K.H. Sprugel, A.S. Motani, M.A. Reidy, R. Ross, Inhibition of neointimal smooth muscle accumulation after angioplasty by an antibody to PDGF, *Science* 253 (1991) 1129–1132.
- [16] M.G. Sirois, M. Simons, E.R. Edelman, Antisense oligonucleotide inhibition of PDGFR- $\beta$  receptor subunit expression directs suppression of intimal thickening, *Circulation* 95 (1997) 669–676.
- [17] E.G. Nabel, Z. Yang, S. Liptay, H. San, D. Gordon, C.C. Haudenschild, G.J. Nabel, Recombinant platelet-derived growth factor B gene expression in porcine arteries induces intimal hyperplasia in vivo, *J. Clin. Invest.* 91 (1993) 1822–1829.
- [18] C.H. Heldin, Dimerization of cell surface receptors in signal transduction, *Cell* 80 (1995) 213–223.
- [19] K. Shimokado, T. Yokota, K. Umezawa, T. Sasaguri, J. Ogata, Protein tyrosine kinase inhibitors inhibit chemotaxis of vascular smooth muscle cells, *Arterioscler. Thromb.* 14 (1994) 973–981.
- [20] G.E. Bilder, J.A. Krawiec, K. McVety, A. Gazit, C. Gilon, R. Lyall, A. Zilberstein, A. Levitzki, M.H. Perrone, A.B. Schreiber, Tyrphostins inhibit PDGF-induced DNA synthesis and associated early events in smooth muscle cells, *Am. J. Physiol.* 260 (1991) C721–C730.
- [21] A. Ito, H. Shimokawa, T. Kadokami, Y. Fukumoto, M.K. Owada, T. Shiraishi, R. Nakaie, T. Takayanagi, K. Egashira, A. Takeshita, Tyrosine kinase inhibitor suppresses coronary arteriosclerotic changes and vasospastic responses induced by chronic treatment with interleukin-1 beta in pigs in vivo, *J. Clin. Invest.* 96 (1995) 1288–1294.
- [22] E. Buchdunger, J. Zimmermann, H. Mett, T. Meyer, M. Muller, U. Regenass, N.B. Lydon, Selective inhibition of the platelet-derived growth factor signal transduction pathway by a protein-tyrosine kinase inhibitor of the 2-phenylaminopyrimidine class, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995) 2558–2562.
- [23] E. Buchdunger, C.L. Cioffi, N. Law, D. Stover, S. Ohno-Jones, B.J. Druker, N.B. Lydon, Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 295 (2000) 139–145.
- [24] E. Buchdunger, J. Zimmermann, H. Mett, T. Meyer, M. Muller, B.J. Druker, N.B. Lydon, Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative, *Cancer Res.* 56 (1996) 100–104.
- [25] M. Carroll, S. Ohno-Jones, S. Tamura, E. Buchdunger, J. Zimmermann, N.B. Lydon, D.G. Gilliland, B.J. Druker, CGP 57148, a tyrosine kinase inhibitor, inhibits the growth of cells expressing BCR-ABL, TEL-ABL, and TEL-PDGFR fusion proteins, *Blood* 90 (1997) 4947–4952.
- [26] B.J. Druker, S. Tamura, E. Buchdunger, S. Ohno, G.M. Segal, S. Fanning, J. Zimmermann, N.B. Lydon, Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells, *Nat. Med.* 2 (1996) 561–566.
- [27] M.C. Heinrich, D.J. Griffith, B.J. Druker, C.L. Wait, K.A. Ott, A.J. Zigler, Inhibition of c-kit receptor tyrosine kinase activity by STI 571, a selective tyrosine kinase inhibitor, *Blood* 96 (2000) 925–932.
- [28] W.L. Wang, M.E. Healy, M. Sattler, S. Verma, J. Lin, G. Maulik, C.D. Stiles, J.D. Griffin, B.E. Johnson, R. Salgia, Growth inhibition and modulation of kinase pathways of small cell lung cancer cell lines by the novel tyrosine kinase inhibitor STI 571, *Oncogene* 19 (2000) 3521–3528.
- [29] L.K. Shawver, D. Slamon, A. Ullrich, Smart drugs: tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy, *Cancer Cell* 1 (2002) 117–123.
- [30] B.J. Druker, STI571 (Gleevec) as a paradigm for cancer therapy, *Trends Mol. Med.* 8 (4 Suppl.) (2002) S14–S18.
- [31] M. Myllarniemi, J. Frosen, L.G. Calderon Ramirez, E. Buchdunger, K. Lemstrom, P. Hayry, Selective tyrosine kinase inhibitor for the platelet-derived growth factor receptor in vitro inhibits smooth muscle cell proliferation after reinjury of arterial intima in vivo, *Cardiovasc. Drugs Ther.* 13 (1999) 159–168.
- [32] P. Boucher, M. Gotthardt, W.P. Li, R.G. Anderson, J. Herz, LRP: role in vascular wall integrity and protection from atherosclerosis, *Science* 300 (2003) 329–332.
- [33] R.K. Sihvola, J.M. Tikkanen, R. Krebs, E.M. Aaltola, E. Buchdunger, O. Laitinen, P.K. Koskinen, K.B. Lemstrom, Platelet-derived growth factor receptor inhibition reduces allograft arteriosclerosis of heart and aorta in cholesterol-fed rabbits, *Transplantation* 75 (2003) 334–339.
- [34] O. Leppänen, J. Rutanen, M.O. Hiltunen, T.T. Rissanen, M.P. Turunen, T. Sjöblom, J. Brügggen, G. Bäckström, M. Carlsson, E. Buchdunger, D. Bergqvist, K. Alitalo, C.H. Heldin, A. Östman, S. Ylä-Herttuala, Oral imatinib mesylate (STI571/gleevec) improves

- the efficacy of local intravascular vascular endothelial growth factor-C gene transfer in reducing neointimal growth in hypercholesterolemic rabbits, *Circulation* 109 (2004) 1140–1146.
- [35] A. Dudley, R.E. Gilbert, D. Thomas, A. Cox, J.T. Price, J. Best, A. Jenkins, STI-571 inhibits in vitro angiogenesis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 310 (2003) 135–142.
- [36] O.A. Coso, M. Chiariello, J.C. Yu, H. Teramoto, P. Crespo, N. Xu, T. Miki, J.S. Gutkind, The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway, *Cell* 81 (1995) 1137–1146.
- [37] C. Castro, A. Díez-Juan, M.J. Cortés, V. Andrés, Distinct regulation of mitogen-activated protein kinases and p27Kip1 in smooth muscle cells from different vascular beds. A potential role in establishing regional phenotypic variance, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 4482–4490.
- [38] P. Libby, K.V. O'Brien, Culture of quiescent arterial smooth muscle cells in a defined serum-free medium, *J. Cell. Physiol.* 115 (1983) 217–223.
- [39] M.R. Campanero, M. Armstrong, E. Flemington, Distinct cellular factors regulate the c-myc promoter through its E2F element, *Mol. Cell. Biol.* 19 (1999) 8442–8450.
- [40] C. Desdouets, G. Matesic, C.A. Molina, N.S. Foulkes, P. Sassone-Corsi, C. Bréchet, J. Sobczak-Thépot, Cell cycle regulation of cyclin A gene expression by the cyclic AMP-responsive transcription factors CREB and CREM, *Mol. Cell. Biol.* 15 (1995) 3301–3309.
- [41] B. Henglein, X. Chenivresse, J. Wang, D. Eick, C. Bréchet, Structure and cell cycle-regulated transcription of the human cyclin A gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994) 5490–5494.
- [42] A.M. Sylvester, D. Chen, K. Krasinski, V. Andrés, Role of c-fos and E2F in the induction of cyclin A transcription and vascular smooth muscle cell proliferation, *J. Clin. Invest.* 101 (1998) 940–948.
- [43] R.J. Davis, The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 14553–14556.
- [44] M. Myllarniemi, L. Calderon, K. Lemstrom, E. Buchdunger, P. Hayry, Inhibition of platelet-derived growth factor receptor tyrosine kinase inhibits vascular smooth muscle cell migration and proliferation, *FASEB J.* 11 (1997) 1119–1126.
- [45] R. Sihvola, P. Koskinen, M. Myllarniemi, M. Loubtchenkov, P. Hayry, E. Buchdunger, K. Lemstrom, Prevention of cardiac allograft arteriosclerosis by protein tyrosine kinase inhibitor selective for platelet-derived growth factor receptor, *Circulation* 99 (1999) 2295–2301.
- [46] I. Barlat, B. Henglein, A. Plet, N. Lamb, A. Fernandez, F. McKenzie, J. Pouyssegur, A. Vie, J.M. Blanchard, TGF-beta 1 and cAMP attenuate cyclin A gene transcription via a cAMP responsive element through independent pathways, *Oncogene* 11 (1995) 1309–1318.
- [47] A. Schulze, K. Zerfass, D. Spitkovsky, S. Middendorp, J. Berges, K. Helin, P. Jansen-Durr, B. Henglein, Cell cycle regulation of the cyclin A gene promoter is mediated by a variant E2F site, *Proc Natl Acad Sci USA* 92 (1995) 11264–11268.
- [48] M. Yoshizumi, C.M. Hsieh, F. Zhou, J.C. Tsai, C. Patterson, M.A. Perrella, M.E. Lee, The ATF site mediates downregulation of the cyclin A gene during contact inhibition in vascular endothelial cells, *Mol. Cell. Biol.* 15 (1995) 3266–3272.

### TRABAJO 3

#### **Atheroma development in apolipoprotein E-null mice is not regulated by phosphorylation of p27(Kip1) on threonine 187.**

**Silvia M. Sanz-González**, Raquel Melero-Fernández de Mera, Nisar P. Malek, and Vicente Andrés

**Journal of Cellular Biochemistry 97:735-743 (2006)**

En este trabajo se incluyen los estudios llevados a cabo para cumplir con el **Objetivo 2** de esta Tesis Doctoral: Investigar si la fosforilación de la proteína p27<sup>Kip1</sup> en T187 es importante en la regulación del desarrollo del ateroma en ratones deficientes en apoE alimentados con dieta rica en grasa y colesterol.

**RESUMEN:** Se cree que la proliferación celular excesiva contribuye al desarrollo de la lesión neointimal durante los procesos de aterosclerosis y reestenosis post-angioplastia. La inhibición de la actividad CDK por p27<sup>Kip1</sup> inhibe el crecimiento celular en mamíferos. Además, se ha demostrado que p27<sup>Kip1</sup> regula negativamente el engrosamiento de la neointima, tanto en modelos animales de reestenosis como de aterosclerosis, y su pauta de expresión en lesiones vasculares obstructivas humanas apoya esta idea. La progresión durante la fase G1 tardía del ciclo celular está facilitada por la degradación de p27<sup>Kip1</sup> como consecuencia de su fosforilación en la T187. El objetivo de este estudio fue averiguar si esta fosforilación juega un papel durante el proceso de aterosclerosis. Para ello, generamos ratones deficientes en apoE con los dos alelos de p27<sup>Kip1</sup> reemplazados por una forma mutante no fosforilable en T187 (ratones p27<sup>T187A</sup>-apoE-KO) y analizamos la cinética de formación de ateroma en estos ratones, comparándola con ratones control deficientes en apoE con el gen p27<sup>Kip1</sup> endógeno intacto. Los animales se alimentaron con una dieta rica en grasa y colesterol que provocó una hipercolesterolemia similar en ambos grupos de animales. Sorprendentemente, la expresión de proteína p27<sup>Kip1</sup> no aumentó en el tejido aórtico de ratones p27<sup>T187A</sup>-apoE-KO hipercolesterolémicos comparando con ratones apoE-KO. Además, el tamaño, celularidad, tasa de proliferación y tasa de apoptosis de la lesión fueron indistinguibles en ambos grupos de ratones. En conclusión, y al contrario de experimentos previos de otros autores que demuestran la importancia de la fosforilación

de p27<sup>Kip1</sup> en la T187 sobre el control de su expresión y función en diferentes tejidos y condiciones patofisiológicas, nuestros resultados demuestran que esta fosforilación no está implicada en el control de la expresión aórtica de p27<sup>Kip1</sup> y en el desarrollo de aterosclerosis en ratones hipercolesterolémicos.

# Atheroma Development in Apolipoprotein E-Null Mice Is Not Regulated by Phosphorylation of p27<sup>Kip1</sup> on Threonine 187

Silvia M. Sanz-González,<sup>1</sup> Raquel Melero-Fernández de Mera,<sup>1</sup> Nisar P. Malek,<sup>2</sup> and Vicente Andrés<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Vascular Biology, Department of Molecular and Cellular Pathology and Therapy, Instituto de Biomedicina de Valencia, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Valencia, Spain

<sup>2</sup>Department of Gastroenterology, Hepatology, and Endocrinology, and Institute for Molecular Biology, Hannover Medical School, Hannover, Germany

**Abstract** Excessive cellular proliferation is thought to contribute to neointimal lesion development during atherosclerosis and restenosis after angioplasty. Inhibition of cyclin-dependent kinase (CDK) activity by p27 inhibits mammalian cell growth. Mounting evidence indicates that p27 negatively regulates neointimal thickening in animal models of restenosis and atherosclerosis, and its expression in human neointimal lesions is consistent with such a protective role. Cell cycle progression is facilitated by cyclinE/CDK2-dependent phosphorylation of p27 on threonine 187 (T187) during late G1. The purpose of this study was to assess whether this phosphorylation event plays a role during atherosclerosis. To this end, we generated apolipoprotein E-null mice with both p27 alleles replaced by a mutated form non-phosphorylatable at T187 (apoE<sup>-/-</sup>p27T187A mice) and investigated the kinetics of atheroma development in these animals compared to apoE<sup>-/-</sup> controls with an intact p27 gene. Fat feeding resulted in comparable level of hypercholesterolemia in both groups of mice. Surprisingly, aortic p27 expression was not increased in fat-fed apoE<sup>-/-</sup>p27T187A mice compared with apoE<sup>-/-</sup> controls. Moreover, atheroma size, lesion cellularity, proliferation, and apoptotic rates were undistinguishable in both groups of fat-fed mice. Thus, in contrast to previous studies that highlight the importance of p27 phosphorylation at T187 on the control of p27 expression and function in different tissues and pathophysiological scenarios, our findings demonstrate that this phosphorylation event is not implicated in the control of aortic p27 expression and atheroma progression in hypercholesterolemic mice. *J. Cell. Biochem.* 97: 735–743, 2006. © 2005 Wiley-Liss, Inc.

**Key words:** atherosclerosis; transgenic animal models; protein phosphorylation; p27; cell cycle control

Progression through the mammalian cell cycle requires the sequential activation of holoenzymes composed of a catalytic cyclin-dependent protein kinase (CDK) and a regulatory subunit named cyclin [Morgan, 1995].

Members of the CDK family of inhibitory proteins (CKIs) interact with and inhibit the activity of CDKs/cyclins [Sherr and Roberts, 1999; Vidal and Koff, 2000]. Accumulation of the CKI p27 causes growth arrest, and abnormally low level of p27 protein is associated with pathological states of excessive cell proliferation, including cancer [Sherr and Roberts, 1999; Vidal and Koff, 2000] and vascular obstructive disease [Andrés, 2004] (see below).

The amount of p27 in the cell is regulated primarily at the level of translation [Pagano et al., 1995; Hengst and Reed, 1996; Millard et al., 1997; Servant et al., 2000; Miskimins et al., 2001] and protein turnover [Malek et al., 2001; Kamura et al., 2004]. Studies with cultured cells and genetically modified mice have shown that phosphorylation of p27 on serine 10 (S10) and threonine 187

Grant sponsor: Instituto de Salud Carlos III (Red de Centros RECAVA, C03/01); Grant sponsor: Regional Government of Valencia; Grant number: GV04B-288; Grant sponsor: Spanish Ministry of Education and Science and Fondo Europeo de Desarrollo Regional; Grant number: SAF2004-03057; Grant sponsor: BEFI Fellowship (from the Spanish Ministry of Health to S.M.S.-G.).

\*Correspondence to: Vicente Andrés, PhD, Instituto de Biomedicina de Valencia, C/Jaime Roig 11, 46010 Valencia, Spain. E-mail: vandres@ibv.csic.es

Received 27 July 2005; Accepted 9 September 2005

DOI 10.1002/jcb.20680

© 2005 Wiley-Liss, Inc.

(T187) play a major role in two sequential proteolytic pathways that regulate p27 concentration in G1 and S phase, respectively. Although phosphorylation at S10 seems to account for approximately 70% of the total phosphorylation of p27 [Ishida et al., 2000], the bulk of p27 degradation appears to be mediated by phosphorylation on T187. Nuclear accumulation of p27 during G0/early G1 phase appears to depend on its stabilization via S10 phosphorylation by the Mirk/dyrk1B kinase [Deng et al., 2004]. In contrast, in mitogen-stimulated cells, KIS-dependent phosphorylation of p27 on S10 during G1 leads to p27 binding to CRM1 and its subsequent nuclear export and cytoplasmic proteasomal degradation by a Skp2-independent Kip1 ubiquitination-promoting complex (KPC)-mediated pathway [Hara et al., 2001; Boehm et al., 2002; Ishida et al., 2002; Connor et al., 2003; Kamura et al., 2004], although evidence also exists suggesting the requirement of Skp2 for the degradation of p27 during early G1 [Malek et al., 2001; Kossatz et al., 2004]. Moreover, recent studies have demonstrated that phosphorylation of S10 is dispensable for p27 nuclear export [Kotake et al., 2004]. Jab1/CSN5 and the COP9 signalosome complex have been shown to contribute to the cytoplasmic shuttling and subsequent degradation of p27 in G1 [Tomoda et al., 1999, 2002; Chopra et al., 2002]. Nuclear export and cytoplasmic proteolysis of p27 may serve to lower the nuclear concentration of p27 below a critical threshold, thus, allowing the activation of cyclinE-CDK2 complexes and S-phase progression. Phosphorylation of p27 on T187 by CDK2 is thought to trigger the nuclear pathway for p27 proteolysis, which occurs during the S and G2 phases of the cell cycle via Skp2-dependent multiubiquitylation [Morisaki et al., 1997; Vlach et al., 1997; Carrano et al., 1999; Montagnoli et al., 1999; Sutterluty et al., 1999; Tsvetkov et al., 1999; Nakayama et al., 2000; Malek et al., 2001; Spruck et al., 2001].

Progressive accumulation of cellular and non-cellular material within the subendothelial space of the artery wall to form the so-called neointimal lesion is a hallmark of atherosclerosis. Factors contributing to the accumulation of neointimal cells are the recruitment of circulating leukocytes and excessive macrophage and vascular smooth muscle cell (VSMC) proliferation [Ross, 1999; Lusis, 2000; Libby, 2002; Andrés, 2004]. Activation of neointimal leuko-

cytes triggers an inflammatory response characterized by abundant production of cytokines and chemokines, which exacerbates leukocyte recruitment and proliferation, and induces VSMCs to undergo hyperplastic growth and migration from the tunica media towards the growing neointimal lesion [Libby et al., 1995; Burke-Gaffney et al., 2002]. Evidence implicating p27 as key regulator of vascular re-modeling include the following: (a) p27 protein level in rat and porcine arteries is upregulated at late time points after balloon angioplasty when VSMCs return to a quiescent state, suggesting that induction of p27 may be a protective mechanism that contributes to the cessation of cellular proliferation in mechanically-injured vessels [Chen et al., 1997; Tanner et al., 1998]. Indeed, overexpression of p27 efficiently blocked mitogen- and c-fos-dependent induction of cyclin A promoter activity in cultured VSMCs [Chen et al., 1997; Sylvester et al., 1998], and adenovirus-mediated overexpression of p27 inhibited neointimal thickening in balloon-injured arteries [Chen et al., 1997; Tanner et al., 2000]; (b) p27 may serve as a molecular switch that determines whether VSMCs undergo hypertrophic or hyperplastic growth [Braun-Dullaeus et al., 1999; Servant et al., 2000]; (c) p27 global inactivation increases arterial VSMC and macrophage proliferation and accelerates diet-induced atherosclerosis in fat-fed apolipoprotein E-null mice (apoE<sup>-/-</sup>) [Díez-Juan and Andrés, 2001]; (d) changes in p27 expression might regulate human vascular cell proliferation within atherosclerotic lesions [Tanner et al., 1998; Ihling et al., 1999]; (e) high level of p27 expression coordinately inhibits VSMC proliferation and migration [Díez-Juan and Andrés, 2003]; and (f) differential regulation of p27 might contribute to establishing differences in proliferative and migratory properties of VSMCs, both when comparing neointimal versus medial cells from the same vessel [Olson et al., 2000] or VSMCs from distinct vascular beds [Yang et al., 1998; Castro et al., 2003]. It is also noteworthy that p27 suppression enhances hematopoietic progenitor cell proliferation and facilitates early development of promyeloid cells into macrophages [Liu et al., 1999; Cheng et al., 2000]. In agreement with these findings, transplant of irradiated apoE-null mice with p27-deficient bone marrow (BM) cells enhanced neointimal macrophage content and proliferation and accelerated atherosclerosis in fat-fed



apoE-null mice [Díez-Juan et al., 2004]. Likewise, vascular occlusion was substantially augmented when BM-derived cells from p27-null mice re-populated vascular lesions induced by mechanical injury in recipients with intact p27, in contrast to wild-type BM donors [Boehm et al., 2004].

To further elucidate the molecular mechanisms underlying p27-dependent control of vascular re-modeling, the present study was designed to critically test the importance of p27 phosphorylation on T187 during atherosclerotic plaque progression induced by hypercholesterolemia. To this end, we took advantage of the availability of the p27T187A knock-in mouse, which expresses a mutant form of p27 that cannot be phosphorylated at T187 [Malek et al., 2001], and atherosclerosis-prone apoE<sup>-/-</sup> mice, which develop hypercholesterolemia and atherosclerosis, and re-capitulate important aspects of the human disease [Plump et al., 1992; Zhang et al., 1992].

## MATERIALS AND METHODS

### Animals and Atherogenic Diet

Care of animals was in accordance with the institutional guidelines. Mice deficient in apoE (apoE<sup>-/-</sup>) (C57BL6/J, Charles River) and p27T187A knock-in mice (129sv) [Malek et al., 2001] were mated. The resulting F1 was intercrossed and apoE<sup>-/-</sup> mice heterozygous for p27 (one allele wild-type and the other T187A) from F2 were selected and crossed for five generations to generate the two experimental groups (apoE<sup>-/-</sup> and apoE<sup>-/-</sup>p27T187A).

Mice genotyping was done by PCR using the following primers: apoE-OIMR180 (5'-GCC-TAGCCGAGGGAGAGCCG-3'), apoE-OIMR181 (5'-TGTGACTTGGGAGCTCTGCAGC-3'), apoE-OIMR182 (5'-GCCGCCCGACTGCATCT-3'), p27T187A-H3 (5'-CCAATATGGCGGTGGAA-GGGAGGCTGA-3'), and p27T187A-Y1 (5'-GAGCAGGTTTGTGGCAGTCGTACACCTCC-3') as previously described [Malek et al., 2001; Tan et al., 2004].

At 2 months of age, mice received an atherogenic diet containing 15.8% fat, 1.25% cholesterol, and 0.5% sodium cholate (Ssniff, SM R/M-H S4892-S010, Germany) for 28 days. Blood was withdrawn from the retro-orbital plexus before and after the high diet administration to measure the plasma cholesterol levels using the Infinity Cholesterol liquid stable reagent

(Iberdiagnóstica). Three apoE<sup>-/-</sup> (two females, one male) and five apoE<sup>-/-</sup>p27T187A (three females, two males) mice died during the period of fat feeding.

### Quantification of Atherosclerosis, Proliferation, and Apoptosis

Fat-fed mice were killed and their aortas were first washed in situ with PBS and then fixed with freshly prepared 4% paraformaldehyde/PBS. After removal of the heart and ascending aorta, tissue fixation continued for 16–24 h at 4°C. Specimens were paraffin-embedded and 3- $\mu$ m cross-sections were obtained at the level of the aortic valves and aortic arch.

All analyses were performed by an investigator who was blinded to genotype. To determine the extent of atherosclerosis and lesion cellularity in the aortic valve region, cross-sections were immunostained with rat monoclonal antibody raised against Mac3 (Santa Cruz Biotechnology, sc-19991, 1/200), a macrophage-specific surface glycoprotein [Ho and Springer, 1983] that is expressed within the aortic wall of fat-fed apoE<sup>-/-</sup> mice [Díez-Juan et al., 2004]. Specimens were counterstained with hematoxylin and images were captured with an Olympus CAMEDIA C5060 wide zoom digital camera mounted on a Zeiss Axiolab stereomicroscope. Digital images were analyzed by computer-assisted quantitative planimetry using the Sigma Scan Pro v5.0 software (Jandel Scientific, San Rafael, CA). For each animal, the reported lesion area is the average from nine independent cross-sections (corresponding to three consecutive sections of three different zones of the aortic valve region). Given that no gender differences in lesion size were observed, data from both sexes were included in our analysis. Lesion cellularity (determined as the number of cells per mm<sup>2</sup> of atheroma) was quantified in cross-sections stained with hematoxylin/eosin.

Cell proliferation in atheromatous lesions from the aortic valves was estimated by Ki67 immunohistochemistry. To achieve antigen retrieval, slides were boiled for 10 min in a stainless steel pressure cooker ensuring that slides were fully immersed in 10 mM sodium citrate buffer (pH = 6). Slides were washed with tap water and endogenous peroxidase was blocked for 30 min with 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in methanol. After extensive washes with PBS, slides were blocked for 30 min at room temperature with 5% FBS. After incubation with monoclonal

anti-Ki67 antibody for 40 min at room temperature (clon SP6, prediluted, Master Diagnostica) and extensive washes with PBS, specimens were incubated with biotin-conjugated anti-rabbit secondary antibody for 30 min at room temperature. Immunocomplexes were detected with the ABC system (Vectastin) and DAB peroxidase substrate kit (Vector laboratories). Slides were counterstained with hematoxylin to visualize all nuclei. For each mouse, the number of Ki67-immunoreactive cells per mm<sup>2</sup> of atheroma was averaged from three consecutive sections from the aortic valves.

Apoptosis in the aortic valve region was determined using oligo B from the Apoptag peroxidase in situ oligo ligation kit according to the manufacturer's instructions (Chemikon). For each mouse, three consecutive sections were counterstained with hematoxylin and apoptosis within the atheroma was estimated as the number of apoptotic cells/total number of cells (average from three sections).

#### Western Blot Analysis

Expression of p27 in the aorta of fat-fed mice was determined by Western blot analysis. For each condition, snap-frozen arteries (aortic arch and thoracic aorta) from two animals were pooled and lysed in ice-cold 50 mM HEPES (pH 7.5) containing 150 mM NaCl, 2.5 mM EGTA, 10 mM  $\beta$ -glycerolphosphate, 10% glycerol, 0.1% Tween 20, 0.1 mM NaVO<sub>3</sub>, 1 mM DTT, supplemented with protease inhibitor Complete Mini cocktail (Roche Diagnostics) using a Ultraturrax T25 basic homogenizer. Cell lysates were centrifuged at 14,000 rpm for 20 min at 4°C and the protein concentration in the supernatants was determined by the Bradford assay (BioRad Laboratories). Protein samples (40  $\mu$ g) were separated onto 12% SDS-polyacrylamide gels for Western blot analysis using the following primary antibodies from Santa Cruz Biotechnology: anti-p27 (sc-1641, diluted 1/100) and anti-tubulin (sc-8035, diluted 1/200). Relative protein intensity was determined by densitometry using the Multi Gauge V2.01 software (Fujifilm).

#### Statistical Analysis

Results are reported as mean  $\pm$  SE. In experiments with two groups, differences were evaluated using a two-tail, unpaired *t*-test. For more than two groups, differences were evaluated

using ANOVA and Fisher's PLSD post-hoc test (Statview, SAS Institute, Cary, NC).

## RESULTS

### Phosphorylation of p27 in T187 Is Not Involved in the Control of Aortic p27 Expression and Atheroma Size in Hypercholesterolemic apoE<sup>-/-</sup> Mice

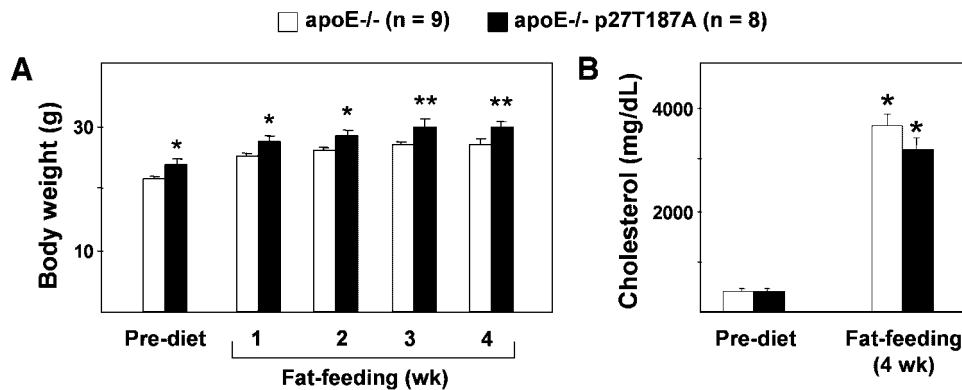
To assess whether phosphorylation of p27 on T187 participates in the control of atherosclerotic plaque progression induced by hypercholesterolemia, we intercrossed p27T187A and atherosclerosis-prone apoE<sup>-/-</sup> mice to generate the two experimental groups: apoE<sup>-/-</sup> (deficient for apoE and intact p27) and apoE<sup>-/-</sup>-p27T187A (deficient for apoE and harboring a mutated p27 gene non-phosphorylatable at T187). At 2 months of age, both groups of mice were subjected to 4 weeks of fat feeding. In agreement with the initial characterization of p27T187A mice [Malek et al., 2001], apoE<sup>-/-</sup>-p27T187A mice displayed higher body weight than did apoE<sup>-/-</sup> controls at all time points examined (Fig. 1A). As expected, exposure to the atherogenic diet for 4 weeks significantly increased plasma cholesterol and no differences were observed when comparing apoE<sup>-/-</sup> and apoE<sup>-/-</sup>-p27T187A mice (Fig. 1B).

We next examined the level of p27 protein in aortic tissue from fat-fed mice. To this end, we pooled the aortic arch and thoracic aorta from two to three animals of each genotype and subjected the lysates to Western blot analysis. Surprisingly, we found no differences in p27 expression when comparing apoE<sup>-/-</sup>-p27T187A and apoE<sup>-/-</sup> mice (Fig. 2). Likewise, atherosclerotic lesion size in the aortic root, as determined by computerized planimetry of cross-sections immunostained with macrophage-specific anti-Mac3 antibody [Ho and Springer, 1983], was undistinguishable when both groups of mice were compared (Fig. 3).

### Histological and Immunohistochemical Characterization of Atherosclerotic Lesions

Given that both cellular proliferation and apoptosis have been demonstrated during atherosclerosis [Ross, 1999; Lusis, 2000; Walsh and Isner, 2000; Libby, 2002; Andrés, 2004] and that p27 dysregulation can affect both processes, we sought to examine whether fat-fed apoE<sup>-/-</sup>-p27T187A mice exhibit reduced cell proliferation compensated for by an attenuated

p27 Phosphorylation on Threonine 187 and Atherogenesis



**Fig. 1.** Body weight and plasma cholesterol level in fat-fed mice. Gender distribution was two females/seven males for apoE<sup>-/-</sup> and three females/five males for apoE<sup>-/-</sup>p27T187A. **A:** Body weight before the onset of the atherogenic diet (pre-diet) and at different times of fat feeding in apoE<sup>-/-</sup> (white bars) and apoE<sup>-/-</sup>p27T187A (black bars) mice. Results were analyzed by AVOVA. For simplicity, only comparisons between genotypes at

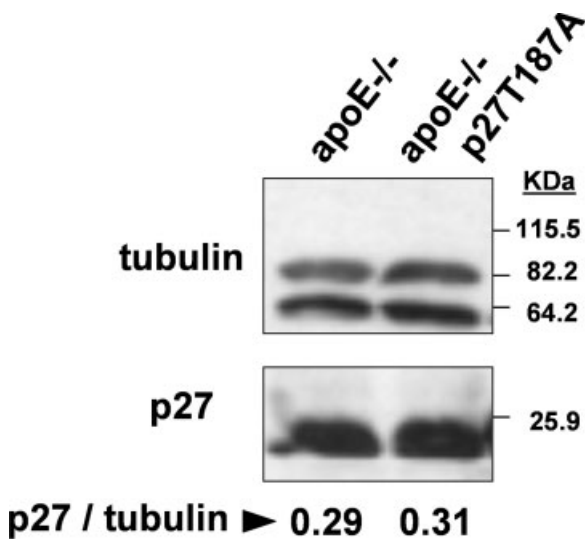
each time are shown (\*,  $P < 0.05$ , \*\*,  $P < 0.01$ ). For both genotypes, body weight increased significantly during the first 2 weeks of fat feeding versus pre-diet values. **B:** Plasma cholesterol level increased significantly in fat-fed mice regardless of genotype (\*,  $P < 0.0001$  vs. pre-diet same genotype), but no differences were seen when comparing apoE<sup>-/-</sup> and apoE<sup>-/-</sup>p27T187A mice.

rate of apoptotic cell death, thus, resulting in normal cellularity and atheroma size. Indeed, histomorphometric analysis of aortic root cross-sections stained with hematoxylin–eosin demonstrated no differences in lesion cellularity in apoE<sup>-/-</sup>p27T187A versus apoE<sup>-/-</sup> mice ( $4,425 \pm 438$  and  $4,149 \pm 334$  cells/mm<sup>2</sup>, respectively,  $P > 0.05$ ) (Fig. 4A). Moreover, cell proliferation (Fig. 4B) and apoptosis (Fig. 4C) were

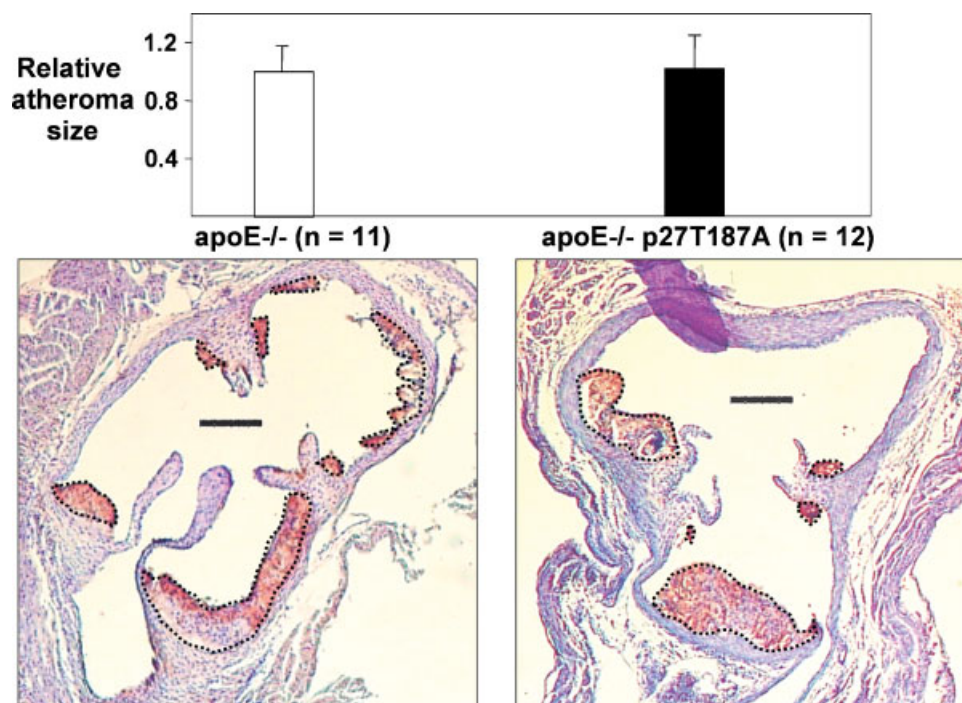
undistinguishable when comparing atheromatous cells from mice of both genotypes, as revealed by immunoreactivity for the proliferation marker Ki67 and ApopTag immunostaining, respectively.

DISCUSSION

Given that genetic inactivation of p27 leads to augmented arterial cell proliferation and accelerates atherosclerosis in fat-fed apoE<sup>-/-</sup> mice [Díez-Juan and Andrés, 2001; Díez-Juan et al., 2004], and that ectopic expression of p27T187A leads to p27 stabilization [Morisaki et al., 1997; Malek et al., 2001; Park et al., 2001; Hurteau et al., 2002], we speculated that apoE<sup>-/-</sup>p27T187A mice would accumulate p27 within the artery wall and display reduced atherosclerosis. However, our studies reveal that both parameters are undistinguishable in fat-fed apoE<sup>-/-</sup>p27T187A mice compared with apoE<sup>-/-</sup> counterparts with an intact p27 gene. Likewise, analysis of atherosclerotic lesions showed that loss of p27 phosphorylation on T187 affects neither cellularity nor the rate of cell proliferation and apoptosis. Thus, physiological level of p27T187A does not affect the course of atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. Of note in this regard, Park et al. [2001] have shown that adenovirus-mediated overexpression of a more stable p27T187M/P188I mutant protein in cancer cells induced stronger G1-S arrest and apoptosis than did wild-type p27. Moreover, these authors showed that



**Fig. 2.** Loss of p27 phosphorylation on T187 does not affect aortic p27 expression in fat-fed apoE-null mice. For each genotype, Western blot analysis was performed on aortic tissue (aortic arch and thoracic aorta) pooled from two 7-month-old males fed the atherogenic diet for 4 weeks. The intensity of p27 protein and tubulin was determined by densitometry using the Multi Gauge V2.01 software to determine the p27/tubulin ratio.



**Fig. 3.** Loss of p27 phosphorylation on T187 does not affect atherosclerosis in fat-fed apoE-null mice. Animals received the atherogenic diet for 4 weeks. Gender distribution was three females/eight males for apoE<sup>-/-</sup> (white bars) and five females/seven males for apoE<sup>-/-</sup>p27T187A (black bars). Atheroma size was quantified in the aortic valves by computerized planimetry of cross-sections immunostained for macrophage-specific Mac3

protein and counterstained with hematoxylin. The photomicrographs show a representative example for each genotype. The discontinuous line marks the boundaries of atherosclerotic lesions and the bar represents 0.2 mm. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com).]

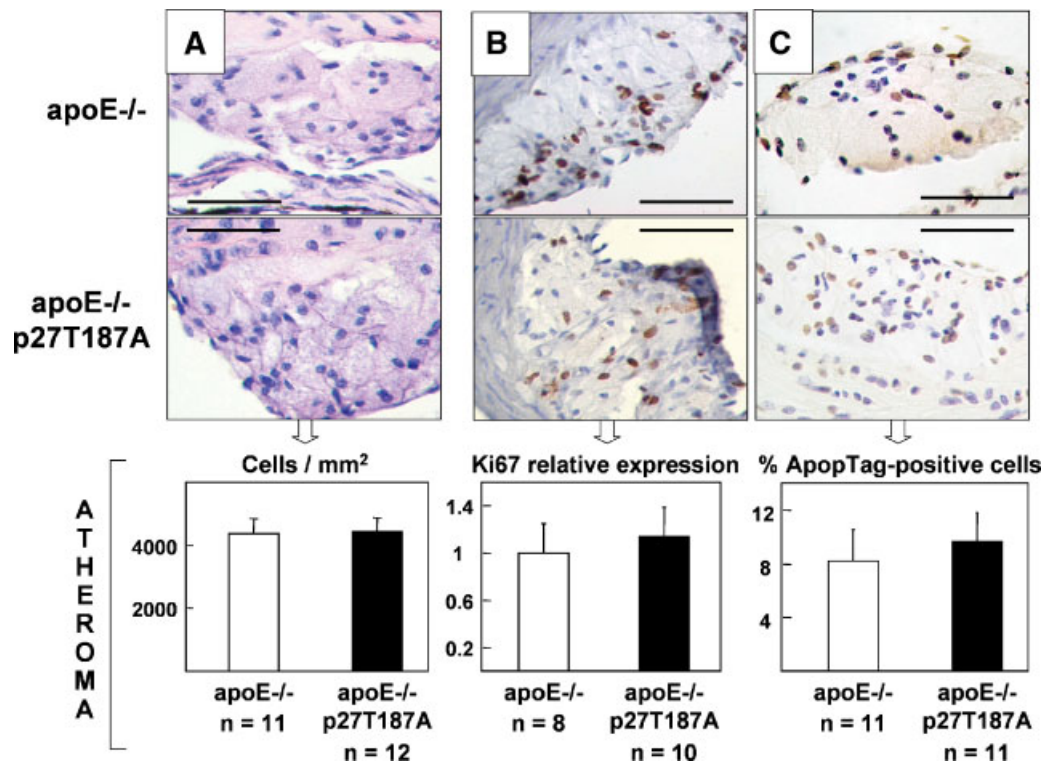
intratumoral injection of adenovirus carrying p27T187M/P188I induced partial regression of established tumors and inhibited the growth of human lung cancer xenografts more strongly than adenovirus encoding for wild-type p27. Whether supraphysiological level of p27T187A or p27T187M/P188I might be effective at inhibiting diet-induced atherosclerosis remains to be investigated.

Previous studies with MEFs isolated from p27T187A mice have shown that p27 is degraded by at least two different proteolytic pathways, which act subsequently during the G1 phase [Malek et al., 2001]. The second pathway, which operates at the G1/S transition, is blocked in p27T187A MEFs resulting in the accumulation of p27T187A to high levels during the remaining phases of the cell cycle. However, it is becoming increasingly evident that the consequences of expressing p27T187A diverge in different cell types, tissues, and pathophysiological conditions. In vitro, DNA replication in stimulated splenic CD4<sup>+</sup> T-lymphocytes expressing p27T187A was reduced by 80% compared with control T-cells, however, expres-

sion of p27T187A in MEFs caused only a 20–30% reduction in serum-dependent S-phase entry and had no effect on thymocytes [Malek et al., 2001]. In vivo, closure of circular punch wounds by re-growth of epithelial cells was delayed in p27T187A mice, and this correlated with reduced BrdU incorporation in keratinocytes at the wound edge (BrdU positive cells in p27T187A = 13.5% vs. control = 35%); however, the healing of incision wounds, which occurs mostly by epithelial cell migration rather than by proliferation, was similar in p27T187A and control mice [Malek et al., 2001]. On the other hand, induction of liver re-generation following partial hepatectomy in p27T187A mice was not accompanied by perturbations in the onset and duration of S phase in hepatocytes, but caused a delay in the passage through G2 compared with control hepatocytes [Kossatz et al., 2004]. However, in spite of this delayed duration of G2, p27T187A hepatocytes did not arrest in mitosis nor did they display changes in ploidy or cell size.

In summary, our results show that aortic expression of p27 and atherosclerosis in

## p27 Phosphorylation on Threonine 187 and Atherogenesis



**Fig. 4.** Loss of p27 phosphorylation on T187 does not affect cellularity, proliferation, and apoptotic rates within the atheroma of fat-fed apoE-null mice. Animals received the atherogenic diet for 4 weeks and cross-sections of the aortic valves region were examined. The top photomicrographs show representative examples (bars represent 50  $\mu$ m) and the graphs show the average in each group of mice. **A:** Cellularity was quantified in sections stained with hematoxylin/eosin. Gender distribution was three females/eight males for apoE<sup>-/-</sup> and five females/

seven males for apoE<sup>-/-</sup>p27T187A. **B:** Proliferation was estimated by immunostaining for Ki67. Gender distribution was two females/six males for apoE<sup>-/-</sup> and four females/eight males for apoE<sup>-/-</sup>p27T187A. **C:** Apoptosis was determined as the percentage of ApopTag-positive cells. Gender distribution was three females/eight males for apoE<sup>-/-</sup> and five females/six males for apoE<sup>-/-</sup>p27T187A. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com).]

hypercholesterolemic mice is not regulated by phosphorylation of p27 on T187A, thus, further supporting the notion that the relevance of this phosphorylation event on the level of p27 protein expression and cell cycle regulation varies in different cell types, tissues, and pathophysiological conditions in vitro and in vivo. It remains to be addressed whether alternative mechanisms of p27 degradation may operate to compensate for the loss of phosphorylation on T187 in apoE<sup>-/-</sup>p27T187A mice. Indeed, it has been suggested that KPC and Spk2 may be functionally redundant [Nakayama et al., 2000]. Given that p27S10A knock-in mice have also revealed striking tissue-specific differences in the level of p27 protein expression (i.e., reduced p27 in the brain, thymus, spleen, testis, and unchanged level in liver, heart, lung, and skeletal muscle) [Kotake et al., 2004], future studies are warranted to analyze the kinetics of atherosclerosis in mice harboring the p27S10A

mutation and in double p27S10A-T187A mutants.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank J. Roberts for providing p27T187A mice, and M. J. Andrés-Manzano for help with the preparation of figures. Work in the laboratory of V.A. is supported in part by grants from Instituto de Salud Carlos III (Red de Centros RECAVA, C03/01), from Regional Government of Valencia (GV04B-288), and from Spanish Ministry of Education and Science and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (SAF2004-03057). S.M.S.-G. is the recipient of a BEFI Predoctoral fellowship from the Spanish Ministry of Health.

## REFERENCES

- Andrés V. 2004. Control of vascular cell proliferation and migration by cyclin-dependent kinase signalling: New perspectives and therapeutic potential. *Cardiovasc Res* 63:11–21.

- Boehm M, Yoshimoto T, Crook MF, Nallamshetty S, True A, Nabel GJ, Nabel EG. 2002. A growth factor-dependent nuclear kinase phosphorylates p27(Kip1) and regulates cell cycle progression. *EMBO J* 21:3390–3401.
- Boehm M, Olive M, True AL, Crook MF, San H, Qu X, Nabel EG. 2004. Bone marrow-derived immune cells regulate vascular disease through a p27(Kip1)-dependent mechanism. *J Clin Invest* 114:419–426.
- Braun-Dullaues RC, Mann MJ, Ziegler A, von der Leyen HE, Dzau VJ. 1999. A novel role for the cyclin-dependent kinase inhibitor p27<sup>Kip1</sup> in angiotensin II-stimulated vascular smooth muscle cell hypertrophy. *J Clin Invest* 104:815–823.
- Burke-Gaffney A, Brooks AV, Bogle RG. 2002. Regulation of chemokine expression in atherosclerosis. *Vascu Pharmacol* 38:283–292.
- Carrano AC, Eytan E, Hershko A, Pagano M. 1999. SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. *Natl Cell Biol* 1:193–199.
- Castro C, Díez-Juan A, Cortés MJ, Andrés V. 2003. Distinct regulation of mitogen-activated protein kinases and p27<sup>Kip1</sup> in smooth muscle cells from different vascular beds. A potential role in establishing regional phenotypic variance. *J Biol Chem* 278:4482–4490.
- Chen D, Krasinski K, Sylvester A, Chen J, Nisen PD, Andres V. 1997. Downregulation of cyclin-dependent kinase 2 activity and cyclin A promoter activity in vascular smooth muscle cells by p27(KIP1), an inhibitor of neointima formation in the rat carotid artery. *J Clin Invest* 99:2334–2341.
- Cheng T, Rodrigues N, Dombkowski D, Stier S, Scadden DT. 2000. Stem cell repopulation efficiency but not pool size is governed by p27<sup>Kip1</sup>. *Natl Med* 6:1235–1240.
- Chopra S, Fernandez De Mattos S, Lam EW, Mann DJ. 2002. Jab1 co-activation of c-Jun is abrogated by the serine 10-phosphorylated form of p27Kip1. *J Biol Chem* 277:32413–32416.
- Connor MK, Kotchetkov R, Cariou S, Resch A, Lupetti R, Beniston RG, Melchior F, Hengst L, Slingerland JM. 2003. CRM1/Ran-mediated nuclear export of p27(Kip1) involves a nuclear export signal and links p27 export and proteolysis. *Mol Biol Cell* 14:201–213.
- Deng X, Mercer SE, Shah S, Ewton DZ, Friedman E. 2004. The cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is stabilized in G(0) by Mirk/dyrk1B kinase. *J Biol Chem* 279:22498–22504.
- Díez-Juan A, Andrés V. 2001. The growth suppressor p27(Kip1) protects against diet-induced atherosclerosis. *FASEB J* 15:1989–1995.
- Díez-Juan A, Andrés V. 2003. Coordinate control of proliferation and migration by the p27Kip1/cyclin-dependent kinase/retinoblastoma pathway in vascular smooth muscle cells and fibroblasts. *Circ Res* 92:402–410.
- Díez-Juan A, Pérez P, Aracil M, Sancho D, Bernad A, Sánchez-Madrid F, Andrés V. 2004. Selective inactivation of p27(Kip1) in hematopoietic progenitor cells increases neointimal macrophage proliferation and accelerates atherosclerosis. *Blood* 103:158–161.
- Hara T, Kamura T, Nakayama K, Oshikawa K, Hatakeyama S. 2001. Degradation of p27(Kip1) at the G(0)-G(1) transition mediated by a Skp2-independent ubiquitination pathway. *J Biol Chem* 276:48937–48943.
- Hengst L, Reed SI. 1996. Translational control of p27Kip1 accumulation during the cell cycle. *Science* 271:1861–1864.
- Ho MK, Springer TA. 1983. Tissue distribution, structural characterization, and biosynthesis of Mac-3, a macrophage surface glycoprotein exhibiting molecular weight heterogeneity. *J Biol Chem* 258:636–642.
- Hurteau JA, Brutkiewicz SA, Wang Q, Allison BM, Goel MG, Harrington MA. 2002. Overexpression of a stabilized mutant form of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) inhibits cell growth. *Gynecol Oncol* 86:19–23.
- Ihling C, Technau K, Gross V, Schulte-Monting J, Zeiher AM, Schaefer HE. 1999. Concordant upregulation of type II-TGF-beta-receptor, the cyclin-dependent kinases inhibitor p27<sup>Kip1</sup> and cyclin E in human atherosclerotic tissue: Implications for lesion cellularity. *Atherosclerosis* 144:7–14.
- Ishida N, Kitagawa M, Hatakeyama S, Nakayama K. 2000. Phosphorylation at serine 10, a major phosphorylation site of p27(Kip1), increases its protein stability. *J Biol Chem* 275:25146–25154.
- Ishida N, Hara T, Kamura T, Yoshida M, Nakayama K, Nakayama KI. 2002. Phosphorylation of p27Kip1 on serine 10 is required for its binding to CRM1 and nuclear export. *J Biol Chem* 277:14355–14358.
- Kamura T, Hara T, Matsumoto M, Ishida N, Okumura F, Hatakeyama S, Yoshida M, Nakayama K, Nakayama KI. 2004. Cytoplasmic ubiquitin ligase KPC regulates proteolysis of p27(Kip1) at G1 phase. *Natl Cell Biol* 6:1229–1235.
- Kossatz U, Dietrich N, Zender L, Buer J, Manns MP, Malek NP. 2004. Skp2-dependent degradation of p27kip1 is essential for cell cycle progression. *Genes Dev* 18:2602–2607.
- Kotake Y, Nakayama K, Ishida N, Nakayama KI. 2004. Role of serine-10 phosphorylation in p27 stabilization revealed by analysis of p27 knock-in mice harboring a serine-10 mutation. *J Biol Chem* 280:1095–1102.
- Libby P. 2002. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420:868–874.
- Libby P, Sukhova G, Lee RT, Galis ZS. 1995. Cytokines regulate vascular functions related to stability of the atherosclerotic plaque. *J Cardiovasc Pharmacol* 25 (Suppl 2): S9–S12.
- Liu Q, VanHoy RW, Zhou JH, Dantzer R, Freund GG, Kelley KW. 1999. Elevated cyclin E levels, inactive retinoblastoma protein, and suppression of the p27<sup>KIP1</sup> inhibitor characterize early development of promyeloid cells into macrophages. *Mol Cell Biol* 19:6229–6239.
- Lusis AJ. 2000. Atherosclerosis. *Nature* 407:233–241.
- Malek NP, Sundberg H, McGrew S, Nakayama K, Kyriakides TR, Roberts JM, Kyriakidis TR. 2001. A mouse knock-in model exposes sequential proteolytic pathways that regulate p27Kip1 in G1 and S phase. *Nature* 413:323–327.
- Millard SS, Yan JS, Nguyen H, Pagano M, Kiyokawa H, Koff A. 1997. Enhanced ribosomal association of p27(Kip1) mRNA is a mechanism contributing to accumulation during growth arrest. *J Biol Chem* 272:7093–7098.
- Miskimins WK, Wang G, Hawkinson M, Miskimins R. 2001. Control of cyclin-dependent kinase inhibitor p27



- expression by cap-independent translation. *Mol Cell Biol* 21:4960–4967.
- Montagnoli A, Fiore F, Eytan E, Carrano AC, Draetta GF, Hershko A, Pagano M. 1999. Ubiquitination of p27 is regulated by Cdk-dependent phosphorylation and trimeric complex formation. *Genes Dev* 13:1181–1189.
- Morgan DO. 1995. Principles of CDK regulation. *Nature* 374:131–134.
- Morisaki H, Fujimoto A, Ando A, Nagata Y, Ikeda K, Nakanishi M. 1997. Cell cycle-dependent phosphorylation of p27 cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitor by cyclin E/Cdk2. *Biochem Biophys Res Commun* 240:386–390.
- Nakayama K, Nagahama H, Minamishima YA, Matsumoto M, Nakamichi I, Kitagawa K, Shirane M, Tsunematsu R, Tsukiyama T, Ishida N, Kitagawa M, Hatakeyama S. 2000. Targeted disruption of Skp2 results in accumulation of cyclin E and p27(Kip1), polyploidy and centrosome overduplication. *EMBO J* 19:2069–2081.
- Olson NE, Kozlowski J, Reidy MA. 2000. Proliferation of intimal smooth muscle cells. Attenuation of basic fibroblast growth factor 2-stimulated proliferation is associated with increased expression of cell cycle inhibitors. *J Biol Chem* 275:11270–11277.
- Pagano M, Tam SW, Theodoras AM, Beer-Romero P, Del Sal G, Chau V, Yew PR, Draetta GF, Rolfe M. 1995. Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science* 269:682–685.
- Park KH, Seol JY, Kim TY, Yoo CG, Kim YW, Han SK, Shim YS, Lee CT. 2001. An adenovirus expressing mutant p27 showed more potent antitumor effects than adenovirus-p27 wild type. *Cancer Res* 61:6163–6169.
- Plump AS, Smith JD, Hayek T, Aalto-Setälä K, Walsh A, Verstuyft JG, Rubin EM, Breslow JL. 1992. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell* 71:343–353.
- Ross R. 1999. Atherosclerosis: An inflammatory disease. *N Engl J Med* 340:115–126.
- Servant MJ, Coulombe P, Turgeon B, Meloche S. 2000. Differential regulation of p27(Kip1) expression by mitogenic and hypertrophic factors: Involvement of transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *J Cell Biol* 148:543–556.
- Sherr CJ, Roberts JM. 1999. CDK inhibitors: Positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13:1501–1512.
- Spruck C, Strohmaier H, Watson M, Smith AP, Ryan A, Krek TW, Reed SI. 2001. A CDK-independent function of mammalian Cks1: Targeting of SCF(Skp2) to the CDK inhibitor p27Kip1. *Mol Cell* 7:639–650.
- Sutterluty H, Chatelain E, Marti A, Wirbelauer C, Senften M, Müller U, Krek W. 1999. p45SKP2 promotes p27Kip1 degradation and induces S phase in quiescent cells. *Natl Cell Biol* 1:207–214.
- Sylvester AM, Chen D, Krasinski K, Andrés V. 1998. Role of c-fos and E2F in the induction of cyclin A transcription and vascular smooth muscle cell proliferation. *J Clin Invest* 101:940–948.
- Tan MH, Sun Z, Opitz SL, Schmidt TE, Peters JH, George EL. 2004. Deletion of the alternatively spliced fibronectin EIIIA domain in mice reduces atherosclerosis. *Blood* 104:11–18.
- Tanner FC, Yang Z-Y, Duckers E, Gordon D, Nabel GJ, Nabel EG. 1998. Expression of cyclin-dependent kinase inhibitors in vascular disease. *Circ Res* 82:396–403.
- Tanner FC, Boehm M, Akyürek LM, San H, Yang Z-Y, Tashiro J, Nabel GJ, Nabel EG. 2000. Differential effects of the cyclin-dependent kinase inhibitors p27<sup>Kip1</sup>, p21<sup>Cip1</sup>, and p16<sup>Ink4</sup> on vascular smooth muscle cell proliferation. *Circulation* 101:2022–2025.
- Tomoda K, Kubota Y, Kato J. 1999. Degradation of the cyclin-dependent-kinase inhibitor p27Kip1 is instigated by Jab1. *Nature* 398:160–165.
- Tomoda K, Kubota Y, Arata Y, Mori S, Maeda M, Tanaka T, Yoshida M, Yoneda-Kato N, Kato JY. 2002. The cytoplasmic shuttling and subsequent degradation of p27Kip1 mediated by Jab1/CSN5 and the COP9 signalosome complex. *J Biol Chem* 277:2302–2310.
- Tsvetkov LM, Yeh KH, Lee SJ, Sun H, Zhang H. 1999. p27(Kip1) ubiquitination and degradation is regulated by the SCF(Skp2) complex through phosphorylated Thr187 in p27. *Curr Biol* 9:661–664.
- Vidal A, Koff A. 2000. Cell-cycle inhibitors: Three families united by a common cause. *Gene* 247:1–15.
- Vlach J, Hennecke S, Amati B. 1997. Phosphorylation-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *EMBO J* 16:5334–5344.
- Walsh K, Isner JM. 2000. Apoptosis in inflammatory-fibroproliferative disorders of the vessel wall. *Cardiovasc Res* 45:756–765.
- Yang Z, Oemar BS, Carrel T, Kipfer B, Julmy F, Lüscher TF. 1998. Different proliferative properties of smooth muscle cells of human arterial and venous bypass vessels: Role of PDGF receptors, mitogen-activated protein kinase, and cyclin-dependent kinase inhibitors. *Circulation* 97:181–187.
- Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N. 1992. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science* 258:468–471.





## TRABAJO 4

### **Increased p53 gene dosage reduces neointimal thickening induced by mechanical injury without affecting atherosclerosis**

**Silvia M. Sanz-González**, Leire Barquín, Isabel García-Cao, Mercè Roqué, M. Teresa Castells, José M. González, Juana M. Flores, Manuel Serrano and Vicente Andrés

En este trabajo se incluyen los estudios llevados a cabo para cumplir con el **Objetivo 3** de esta Tesis Doctoral: Investigar si la ganancia de función p53 inhibe el desarrollo de la neointima en modelos murinos de lesión vascular mecánica y de aterosclerosis, tanto espontánea como inducida por dieta rica en grasa y colesterol.

**RESUMEN:** El supresor tumoral p53 es un factor de transcripción que juega un papel clave en el control de múltiples procesos celulares, incluyendo síntesis y reparación del ADN, proliferación y apoptosis. Estudios en diversos modelos murinos de arteriosclerosis (ratones deficientes en apoE, RLDL y transgénicos para apoE\*3-Leiden) han revelado que la eliminación de ambos alelos de p53, tanto global como selectivamente en los precursores hematopoyéticos, acelera el desarrollo del ateroma, aunque el impacto de la ausencia de p53 sobre la proliferación y apoptosis celular en la placa de ateroma es un tema controvertido. La disponibilidad de ratones transgénicos portadores de un alelo p53 extra (Súper p53), los cuales muestran resistencia al desarrollo de tumores, nos ha permitido investigar si la ganancia de función de p53 puede limitar el desarrollo del ateroma. Con este fin, generamos dos grupos experimentales: ratones apoE-KO (con deficiencia en apoE y dotación génica normal de p53) y ratones Súper p53-apoE-KO (con deficiencia en apoE y un alelo p53 adicional). Comprobamos que estos últimos presentan ganancia de función p53, ya que al irradiarlos se produce una mayor tasa de apoptosis en timocitos comparado con los niveles observados en timocitos de controles apoE-KO irradiados. Además, de acuerdo con estudios previos en los que se demostró que la sobreexpresión intraluminal de p53 mediante transfección con liposomas o vectores adenovirales reduce el crecimiento de lesiones obstructivas inducidas por daño mecánico o injerto vascular, observamos en ratones Súper p53-apoE-KO una reducción en el engrosamiento de la lesión neointima y en el porcentaje de oclusión luminal en la arteria femoral sometida a daño mecánico en comparación

con los vasos de controles apoE-KO, sin verse afectada la tasa de apoptosis. Sin embargo, el tamaño de las lesiones ateromatosas en la aorta fue comparable en ambos grupos de ratones, tanto si se mantenían con dieta control o rica en grasa y colesterol. En concordancia con estos resultados, el ateroma de los ratones apoE-KO y Súper p53-apoE-KO presentó una celularidad y tasas de proliferación y apoptosis semejantes. Estos resultados sugieren diferencias profundas en el papel de p53 en el contexto de arteriosclerosis y lesión vascular en respuesta a daño mecánico.

## **Increased p53 gene dosage reduces neointimal thickening induced by mechanical injury without affecting atherosclerosis**

Silvia M. Sanz-González \*, Leire Barquín \*\*, Isabel García-Cao \*\*\*, Mercè Roqué \*\*, M. Teresa Castells #, José M. González \*, Juana M. Flores ##, Manuel Serrano \*\*\* and Vicente Andrés \*

\* Vascular Biology Unit, Instituto de Biomedicina de Valencia (IBV-CSIC), Spanish Council for Scientific Research, 46010 Valencia, Spain

\*\* Cardiovascular Institute, Institut d'Investigacions Biomediques August Pi i Sunyer, University of Barcelona, 08036 Barcelona, Spain

\*\*\* Spanish National Cancer Center (CNIO), 28029 Madrid, Spain

# Department of Cell Biology, Medical School, University of Murcia, 30100 Murcia, Spain.

## Complutense University of Madrid, Veterinary School, 28040 Madrid, Spain

### **Send correspondence to:**

Vicente Andrés, Instituto de Biomedicina de Valencia, Spanish Council for Scientific Research, Jaime Roig, 11, 46010 Valencia (Spain), e-mail: vandres@ibv.csic.es.

**SHORT TITLE:** Extra p53 function and neointimal thickening

### **ABSTRACT**

The tumor suppressor p53 is a transcription factor that plays a major role in the control of cell proliferation and apoptosis, two key processes in the pathogenesis of occlusive vascular disease. It has been shown that disruption of both alleles of p53 accelerated atherosclerosis in several murine models of atherosclerosis. In contrast, transient p53 overexpression attenuated neointimal thickening induced by either mechanical injury or vessel grafting. Here, we sought to assess whether genetically-engineered Super-p53 mice carrying one extra p53 allele that reproduces the normal expression and regulation of the endogenous p53 gene are protected from neointimal lesion formation in the setting of both atherosclerosis and vascular mechanical injury. To this end, we examined two groups of atherosclerosis-prone animals: apolipoprotein

E-null mice with normal p53 gene dosage (apoE-KO) and apoE-KO littermates with an additional p53 allele (Super-p53/apoE-KO). The latter displayed extra p53 function, as revealed by augmented apoptosis in thymocytes isolated from irradiated animals. In contrast, neither apoptosis nor cell proliferation were affected by additional p53 gene dosage when examined in established atheromas and mechanically-induced occlusive lesions. Surprisingly, whereas the size of spontaneously formed and diet-induced aortic atherosclerotic lesions was indistinguishable in both groups of mice, neointimal thickening in mechanically-injured femoral arteries was attenuated in Super-p53/apoE-KO as compared to apoE-KO counterparts. Our observations indicate that, in the absence of undesirable effects, heightening p53 function reduces neointimal thickening induced by mechanical vessel denudation without affecting atherosclerosis in a mouse model of familial hypercholesterolemia.

## INTRODUCTION

Atherosclerosis and restenosis post-angioplasty are multifactorial processes which involve complex interactions among a variety of different cell types<sup>1-4</sup>. The development of occlusive neointimal lesions in both diseases is due in part to excessive proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMCs), macrophages and adventitial myofibroblasts<sup>5-7</sup>. Vascular cell loss by apoptotic death, which has been documented in animal and human atherosclerosis and restenosis, also appears to be a major determinant of the size and stability of neointimal lesions<sup>8</sup>. Therefore, unraveling the molecular mechanisms that control neointimal cell growth and apoptosis is of utmost importance to identify therapeutic targets to limit neointimal thickening and prevent plaque rupture.

The tumor suppressor gene p53 is expressed ubiquitously in all cell types as an inactive, latent, transcription factor. Activation of p53 occurs in response to a variety of cellular insults, namely DNA damage (signaled through the ATM and Chk kinases) and oncogenic stress (signaled through the p53-stabilizing protein ARF)<sup>9-11</sup>. Transcriptionally active p53 participates in the expression of proapoptotic (eg, Bax, Fas, PUMA) and antiproliferative (eg, p21<sup>Cip1</sup>, GADD45) genes, and in the repression of antiapoptotic (eg, bcl-2) and proliferative (eg, IGF-II) genes<sup>11</sup>. Whether p53 activation provokes apoptosis or growth arrest, either reversible or permanent (replicative senescence), depends on the context and cellular type. We have previously engineered a p53 transgene that behaves in the mouse as a functional replica of the endogenous gene when expressed in a p53-null genetic background<sup>12</sup>. Super-p53

transgenic mice carrying p53-transgenic alleles in addition to the two endogenous alleles exhibit an enhanced response to DNA damage and are significantly protected from cancer compared with normal mice. Remarkably, in contrast to the early ageing phenotypes observed in transgenic mice overexpressing deregulated p53<sup>13</sup> or its naturally occurring N-terminally truncated form p44<sup>14</sup>, Super-p53 mice age normally<sup>12</sup>. Thus, cancer resistance can be enhanced by a simple genetic modification and in the absence of undesirable effects.

Accumulating evidence has implicated p53 as a critical regulator of pathological vascular remodeling. Human VSMCs from restenosis or instant stenosis sites exhibit augmented responses to p53<sup>15</sup>, and arterial p53 inactivation after human cytomegalovirus infection has been suggested to contribute to coronary restenosis<sup>16,17</sup>. Moreover, p53 is overexpressed but not mutated in human atherosclerotic tissue<sup>18</sup>, and expression studies in human endarterectomy specimens have suggested a role for p53 as a negative regulator of neointimal thickening<sup>19,20</sup>. Indeed, gain- and loss-of-function studies have causally linked p53 and fibroproliferative vascular disease. First, both global and hematopoietic cell-specific p53 deficiency aggravates atheroma progression in several murine models of diet-induced atherosclerosis<sup>21-24</sup>. Likewise, p53-null mice exhibit accelerated neointimal thickening induced by vein grafting<sup>25</sup>, external vascular cuff placement<sup>26</sup>, and mechanical denudation<sup>27</sup>. Second, intraluminal transfection of antisense p53 oligodeoxynucleotides into intact rat carotid artery results in abnormal VSMC growth<sup>28</sup>, and p53 gene transfer attenuates neointimal thickening in balloon-injured rat and rabbit carotid artery<sup>29,30</sup>, porcine saphenous vein grafts<sup>31</sup>, and organ cultures of human saphenous vein<sup>32</sup>. Notably, adenovirus-mediated p53 transfer to pre-established atheromas induced by implantation of a perivascular collar promoted vulnerability to plaque rupture<sup>33</sup>.

While the mentioned studies all convincingly establish that endogenous and ectopically expressed p53 limit neointimal thickening, the role of p53 on neointimal cell proliferation and apoptosis is controversial (see Discussion). Moreover, none of the studies examined the consequences of heightening p53 function on diet-induced atherosclerosis. In this study, we sought to examine occlusive vascular lesion development in the setting of atherosclerosis and mechanical injury of the vessel wall in mice carrying an extra p53 allele that reproduces the normal expression and regulation of the endogenous p53 gene. To this end, we crossed atherosclerosis-prone apoE-KO<sup>34</sup> and Super-p53<sup>12</sup> mice to generate Super-p53/apoE-KO mice. Compared to apoE-KO littermates with normal p53 dosage, Super-p53/apoE-KO mice exhibit reduced neointimal thickening in mechanically-injured femoral artery but, surprisingly, developed normal aortic atherosclerosis.

## MATERIALS AND METHODS

**Mice, genotyping and diets.** Care of animals was in accordance with institutional guidelines. apoE-KO (C57BL6/J, Charles River) and Super-p53 (C57BL6/J, tg/tg carrying two extra copies of the p53 transgene)<sup>12</sup> mice were mated. The resulting heterozygous F1 was crossed with apoE-KO mice, and F2 apoE-KO mice with or without one extra p53 allele (Super-p53/apoE-KO and apoE-KO, respectively) were used for our studies. Additional experimental mice were obtained by crossing apoE-KO and Super-p53/apoE-KO mice. Genotyping was done by PCR as previously described<sup>12,35</sup>. Primers for apoE genotyping were apoE-OIMR180 (5'-GCCTAGCCGAGGGAGAGCCG-3'), apoE-OIMR181 (5'-TGTGACTTGGGAGCTCTGCAGC-3'), and apoE-OIMR182 (5'-GCCGCCCCGACTGCATCT-3'). Primers for p53 transgene genotyping were SP6-BAC (5'-GCTATGACCATGATTACGCCAAG-3'), SP6-tg (5'-CTAAGTCCCTCTGCATGTGG-3'), T7-BAC (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') and T7-tg (5'-GAGTCAGGGGTGGGAACTTGG-3').

Mice for spontaneous atherosclerosis and mechanical injury models were kept on a low fat (2.8% fat), standard rodent diet (catalog number 2014, Teklad global rat/mouse chow, Harlan Interfauna, Spain). Mice for the diet-induced atherosclerosis model were kept on the regular chow diet for 2 months and then were switched to a high-fat diet containing 12.8% fat, 1.25% cholesterol and 0.5% sodium cholate (catalog number S4892-S010, Ssniff, Germany) for the indicated periods of time. Three Super-p53/apoE-KO and one apoE-KO mice died during the period of fat-feeding. Blood was withdrawn from the retroorbital plexus before and after the high-fat diet administration to measure plasma cholesterol levels using the Infinity Cholesterol liquid stable reagent (Iberdiagnóstica, Spain).

**Irradiation and analysis of apoptosis.** Two-month-old mice fed control diet underwent whole-body irradiation as previously described (4.1 Gy/min for a total of 10 Gy using a <sup>137</sup>Cs source)<sup>12</sup>. Three hours later, control and irradiated mice were sacrificed and thymocytes were isolated and stained with propidium iodide to determine the percentage of apoptotic thymocytes by flow cytometry (EPICS XL Cytometer, Coulter Corporation, USA). Cells with sub-2N DNA contents were considered apoptotic.

**Quantification of atheroma size.** Mice maintained on low-fat or high-fat diet (spontaneous or diet-induced atherosclerosis, respectively, see above) were euthanized with ether and their aortas were first washed *in situ* with PBS and then fixed with freshly prepared 4% paraformaldehyde/PBS. The heart, pulmonary artery and aorta were extracted, and fixation continued for 16-24 hours at 4°C. Quantification of aortic atheroma size was done by computer-assisted quantitative morphometry of hematoxylin/eosin-stained 3- $\mu\text{m}$  cross-sections (obtained from three different zones of the ascending aorta separated 30  $\mu\text{m}$ , starting at the end of the aortic valve), or *en face* Oil Red O staining (0.2% in 80% MeOH) (SIGMA), essentially as described before<sup>36</sup>. Images were captured with an Olympus CAMEDIA C5060 wide zoom digital camera mounted on a Zeiss Axiolab stereomicroscope and were analyzed by an investigator who was blinded to genotype.

**Quantification of neointimal lesion development induced by mechanical denudation of the femoral artery.** Female mice (4 to 5 months of age) maintained in control diet were anesthetized with Forane and underwent bilateral endoluminal injury to the common femoral artery by passing 3 times a 0.25 mm-diameter angioplasty guidewire as described previously<sup>37</sup>. For post-operative analgesia, Buprex was administered subcutaneously. Seams, ulcers and scars suggesting limb ischemia were controlled daily. After 4 wks, mice were killed and perfused *in situ* with 5 mL of PBS followed by 10 mL of freshly prepared 4% paraformaldehyde/PBS using a peristaltic pump at approximately 1 mL/min. Both hindlimbs and pelvis were isolated in block and fixation continued for 24-28 hours. Specimens were decalcified for 24 hours at room temperature with mild shaking in Osteodec (Bio-Optica). After washes with PBS, transverse segments (approximately 2 mm thick) were cut at the level of the injury, embedded in paraffin, and 5- $\mu\text{m}$  cross-sections were obtained throughout the injured segment. Images of specimens from 3-5 different regions were captured using a Leica TCS/SP2 confocal microscope (20X objective, argon laser of 488 nm). Under these conditions, the internal and external elastic lamina exhibit bright autofluorescence<sup>38</sup>. Only sections showing both the external and internal elastic lamina were used to quantify, by an operator who was blinded to genotype, the area occupied by the intima, media and lumen (Leica LCS Lite software). Results for each artery represent the average of all the measurements obtained from 3-5 different zones of the injured segment.

One Super-p53/apoE-KO mouse was discarded because atherosclerosis in the femoral artery was visible previous to the surgical procedure. One femoral artery in one apoE-KO was not subjected to

injury due to its small caliber, and one apoE-KO mouse was sacrificed during the post-operative period because of severe foot ischemia.

**Immunohistological analysis.** Immunohistological examination of paraformaldehyde/PBS-fixed 5- $\mu$ m cross-sections was carried out by an operator who was blinded to genotype. Lesion cellularity was determined in hematoxylin/eosin-stained specimens. Apoptosis was determined using oligo B from Apoptag peroxidase *in situ* oligo ligation kit according to the manufacturer's instructions (Chemikon). Sections were counterstained with hematoxylin.

Macrophages were visualized with rat monoclonal anti-MAC-3 antibody (Santa Cruz Biotechnology, sc-19991; 1/200, 1h, 37°C). Cell proliferation in the atherosclerosis and mechanical injury models was estimated with rabbit monoclonal anti Ki67 (Master Diagnostica, clon SP6, prediluted, 40 min, room temperature) and rabbit polyclonal anti-proliferating cell nuclear antigen (PCNA) (Santa Cruz Biotechnology, sc-7907; 1/50, 1h, room temperature) antibodies, respectively. For Ki67 antigen retrieval, slides were immersed in 10 mM sodium citrate buffer (pH=6) and boiled for 10 minutes in a pressure cooker, followed by washes with tap water. Slides were incubated for 30 min with 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/methanol to block endogenous peroxidase, washed with PBS, and blocked for 30 minutes at room temperature with 5% FBS. After primary antibody incubation and washes, specimens were incubated at 37°C with species appropriated biotinylated secondary antibodies. Immunocomplexes were detected with the ABC (Vectastain) and diaminobenzidine (Vector laboratories) kits. Slides were counterstained with hematoxylin.

Neointimal collagen content was quantified using Masson Trichrome staining (all reagents from Panreac). Briefly, slides were stained with Weigert hematoxylin (5 min), washed with tap water (10 min), stained with 1% acid fuchsin solution (5-25 min), washed in 1% acetic water and 5% fosfotunstenic acid (5 min) and stained with 2% aniline blue (30-60 s). Images were captured with an Olympus CAMEDIA C5060 wide zoom digital camera mounted on a Zeiss Axiolab stereomicroscope. Aortic and femoral artery cross-sections were quantified by computerized image analysis. All images were captured in one session during which microscope illumination and camera settings were identical. Red-Green-Blue-filtered grey scale values from images were analyzed using Mip 4.5 (Microm Image Processing software, Consulting Image Digital, Barcelona, Spain) by an operator who was blinded to genotype. Red channel was used to the grey level analysis because it gave maximum contrast. The digital image consists of a 512 x 512 matrix of pixels, where each pixel consisted of a number between 0 (black) and 255



(white) representing the intensity of transmitted light or grey level at a point. Grey level was related with collagen content (darkest corresponded to highest collagen content). Analysis was performed in the inverted (negative) image in order to have the highest values corresponding to highest collagen content. Regions containing collagen fibers were selected and area and medium grey level in the negative image were measured. Intima area was also measured. Relative collagen content was estimated using the following equation:

$$\text{Collagen content} = \text{Collagen area} \times \text{Average collagen grey level} / \text{Total atheroma area}$$

**Statistical analysis.** Results are reported as mean  $\pm$  SE. In experiments with two groups, differences were evaluated using a 2-tail, unpaired t-test. For more than two groups, differences were evaluated using ANOVA and Fisher's *post-hoc* test (Statview, SAS institute, Cary, North Carolina). Differences were considered statistically significant at  $p \leq 0.05$ .

## RESULTS

### Super-p53/apoE-KO mice exhibit extra p53 activity.

To assess the consequences of increasing p53 activity on atheroma development, we analyzed apoE-KO and Super-p53/apoE-KO mice, which have normal p53 gene dosage and one extra p53 allele, respectively. The apoE-KO mouse spontaneously develops hypercholesterolemia and complex atherosclerotic lesions resembling those observed in humans and which can be accelerated by a high-fat cholesterol-rich diet<sup>34</sup>. We previously showed that Super-p53 mice carrying p53 transgenic alleles in addition to the two endogenous alleles exhibit enhanced DNA damage response, are tumor resistant and age normally<sup>12</sup>. Importantly, the p53 transgenic allele, when present in a p53-null genetic background, behaves as a functional replica of the endogenous gene<sup>12</sup>. Thus, we first sought to assess whether Super-p53/apoE-KO mice also exhibit enhanced DNA damage response as compared with apoE controls. As expected, whole body irradiation in both groups of mice increased the population of thymocytes with DNA content  $<2N$ , as determined by flow cytometry, but this response was exaggerated in Super-p53/apoE-KO compared to apoE-KO mice (Fig. 1A). Therefore, the p53 transgene in Super-p53/apoE-KO mice appears functional.

## **Extra p53 gene dosage does not affect the size of diet-induced and spontaneously formed atheromas**

We first compared the size of atherosclerotic lesions in fat-fed apoE-KO and Super-p53/apoE-KO mice. Average body weight before the onset of the experimental diet and throughout the period of fat-feeding was indistinguishable in both groups of mice (Fig. 1B). Likewise, the severity of hypercholesterolemia induced by fat feeding was not affected by the presence of an extra p53 allele (Fig. 1C). As shown in Fig. 2A, quantification of the intima-to-media ratio (I/M) in cross-sections from three different zones (I, II, III) of the ascending aorta revealed diminished atherosclerosis as specimens were farther from the aortic valve ( $I/M_I > I/M_{II} > I/M_{III}$ ). Whilst we noted a tendency towards reduced atherosclerosis in the most atherogenic aortic root (region I) in Super-p53/apoE-KO compared to apoE-KO mice ( $IM_I = 1.79 \pm 0.20$  versus  $2.31 \pm 0.18$ , respectively,  $p = 0.06$ ), lesions of similar size were observed in regions II and III of both groups of fat-fed mice ( $I/M_{II} = 0.97 \pm 0.15$  versus  $1.15 \pm 0.10$ , respectively,  $p = 0.32$ ;  $I/M_{III} = 0.46 \pm 0.08$  versus  $0.57 \pm 0.09$ , respectively,  $p = 0.40$ ). Examination of the pulmonary artery in the same cross-sections used to quantify aortic atherosclerosis also disclosed similar I/M in both groups of mice (data not shown). Likewise, analysis of atheroma size in the aortic arch and thoracic aorta of fat-fed mice revealed no statistically significant differences between apoE-KO and Super-p53/apoE-KO mice, as determined by Oil Red O staining of en face preparations of the aorta (Fig. 2B).

Unlike other murine models that require a Western-type diet for atheroma development, apoE-KO mice fed standard chow develop spontaneous atherosclerosis<sup>39</sup>. Therefore, we also analyzed a group of 6-month-old mice that had been always fed control chow. In agreement with our results in fat-fed mice, plasma cholesterol (data not shown) and the size of atheromas within the aortic arch and thoracic aorta were indistinguishable between apoE-KO and Super-p53/apoE-KO mice (Fig. 2C). Likewise, analysis of 5-month-old mice revealed no differences in spontaneously formed aortic atheromas (data not shown). Collectively, these studies demonstrate that increasing p53 function does not attenuate neither diet-induced nor spontaneous atherosclerosis in apoE-KO mice.

## **Super-p53/apoE-KO mice exhibit reduced neointimal thickening in mechanically-injured femoral arteries**

Previous studies have established the efficacy of transiently overexpressed p53 in attenuating neointimal lesion formation induced by mechanical denudation<sup>29,30</sup> and vessel grafting<sup>31,32</sup>. Thus, we next sought

to assess if extra p53 function can limit neointimal thickening induced by mechanical denudation of the artery wall, a key event in the pathogenesis of restenosis post-angioplasty <sup>1</sup>. Using a femoral artery model of endoluminal mechanical injury <sup>37</sup>, we found that both the I/M ratio and the percentage of luminal stenosis were significantly reduced in Super-p53/apoE-KO compared to apoE-KO mice when these parameters were examined four wks after intervention (Fig. 3).

### **Histological and immunohistochemical characterization of neointimal lesions**

Neointimal cell proliferation and apoptotic cell death are a hallmark of atherosclerosis and restenosis <sup>8</sup>. The net balance between these antagonistic processes is a major determinant of the lesion's cellular content, thus influencing both its size and stability. Since p53 is a key regulator of cell proliferation and apoptosis <sup>10</sup>, we sought to examine these processes in the arterial wall of apoE-KO and Super-p53/apoE-KO mice.

For the diet-induced atherosclerosis model, Ki67 immunoreactivity and the Apoptag kit were used to estimate cell proliferation and apoptosis, respectively. We examined cross-sections of the ascending aorta from mice challenged for 7 wks with the high-fat diet. Neointimal proliferation (Fig. 4A) and apoptosis (Fig. 4B) were unaffected by extra p53 gene dosage. Notably, the number of neointimal apoptotic cells was very low ( $5.1 \pm 1.5$  and  $6.3 \pm 0.6$  cells/mm<sup>2</sup> in apoE-KO and Super-p53/apoE-KO mice, respectively). Neointimal cellularity (Fig. 4C) and macrophage content (Fig. 4D) were also similar when comparing fat-fed apoE-KO and Super-p53/apoE-KO mice. Comparatively, Ki67 immunoreactivity and apoptosis were very scant within the media (data not shown).

Femoral artery neointimal lesions were examined 4 wks after mechanical injury. We examined cellular proliferation by PCNA-immunostaining because the decalcification protocol employed to allow tissue sectioning drastically hindered Ki67 immunoreactivity (data not shown). Compared to diet-induced atheromas, analysis of mechanically-injured femoral arteries revealed much higher rates of neointimal and medial apoptosis (Fig. 5A) and proliferation (Fig. 5B). However, these parameters were statistically indistinguishable in both groups of mice.

Lastly, we examined in both models neointimal collagen content, an important determinant of lesion stability <sup>40</sup>. Arterial cross-sections were stained with Masson Trichrome, which stains collagen fibers in blue. Although the differences did not reach statistical significance ( $p > 0.05$ ), neointimal collagen content tended to be lower in Super-p53/apoE-KO as compared to apoE-KO mice (27% and 42% reduction in

atherosclerosis and mechanical injury models, respectively) (Fig 6). These findings suggest that gain of p53 function may promote lesion vulnerability.

## DISCUSSION

It has been shown that p53 inactivation aggravates occlusive vascular lesion formation in the setting of diet-induced atherosclerosis<sup>21-24</sup>, vein grafting<sup>25</sup>, perivascular cuff placement<sup>26</sup>, and mechanical denudation<sup>27</sup>, indicating that endogenous p53 expression limits neointimal thickening. Consistent with this notion, transient p53 overexpression attenuated neointimal lesion formation induced by mechanical denudation<sup>29,30</sup> and vessel grafting<sup>31,32</sup>. To assess whether heightening p53 function can reduce diet-induced atherosclerosis, we generated Super-p53/apoE-KO mice carrying one additional p53 allele that reproduces the normal expression and regulation of the endogenous p53 gene. Our results demonstrate that, compared to apoE-KO littermates, Super-p53/apoE-KO mice display additional p53 function (Fig. 1A) and reduced neointimal thickening in mechanically-injured femoral artery (Fig. 3). Unexpectedly, however, heightening p53 function only provoked a modest reduction of diet-induced atherosclerosis in the aortic region of maximal damage (aortic root, confer region I in Fig. 2A), but did not affect atheroma formation in less atherogenic aortic segments (eg. region II and III within ascending aorta, aortic arch and thoracic aorta) (Fig. 2A, B). Likewise, spontaneously formed aortic atheromas were of similar size in apoE-KO and Super-p53/apoE-KO mice (Fig. 2C).

Both antiproliferative and apoptotic actions might contribute to p53-dependent inhibition of neointimal thickening induced by mechanical injury. Previous studies have shown that transiently overexpressed p53 increases apoptosis in medial cells at 48 hours after balloon injury, a time point at which neointimal lesions are not formed yet<sup>41</sup>. On the other hand, p53-null mice display increased proliferation and decreased apoptosis in both medial and neointimal femoral artery cells at 2 wks post-injury, but rapid (4 hrs post-injury) and late (4 wks post-injury) apoptosis were unaffected as compared to wild-type controls<sup>27</sup>. While we also found reduced neointimal thickening in mechanically-injured femoral artery of Super-p53/apoE-KO compared to apoE-KO counterparts, no differences in neointimal and medial cell proliferation and apoptosis were seen at the 4 wks time point analyzed in our studies (Fig. 5). Thus, promotion of apoptosis and inhibition of proliferation during the first 2 wks post-injury may contribute to p53-dependent attenuation of neointimal hyperplasia in this model.

The role of endogenous p53 in the control of neointimal proliferation and apoptosis during atherosclerosis has hitherto remained subject to controversy. While all reports concur in demonstrating that global or macrophage-specific p53 deficiency in apoE-KO, low-density lipoprotein receptor (LDLR)-KO and apoE\*3-Leiden transgenic mice accelerates diet-induced aortic atherosclerosis, two studies suggest that p53 deficiency leads to increased neointimal proliferation without significantly affecting apoptosis (although a tendency towards more apoptosis was seen in one study)<sup>21,23</sup>, and a third study disclosed a tendency towards reduced apoptosis but unaffected cell proliferation<sup>22</sup>. None of these studies identified the lineage of the growing/dying cells. Very recently, Mercer et al. observed in tissue culture experiments that endogenous p53 enhances peritoneal macrophage apoptosis but attenuates apoptotic death of aortic VSMCs and bone marrow stromal cell<sup>24</sup>, which have been shown to transdifferentiate into cells expressing VSMC makers that participate in the pathogenesis of atherosclerosis<sup>42</sup>. These authors also found that endogenous p53 reduced atherosclerosis in the aorta but not in brachiocephalic artery of apoE-KO mice, and that p53-null brachiocephalic atheromas exhibit increased cell proliferation and reduced apoptosis, with monocytes/macrophages being the predominant proliferating/dying cell type in brachiocephalic atheromas of apoE-KO and doubly deficient p53/apoE-KO mice<sup>24</sup>. Notably, transplant of p53 bone marrow to p53/apoE-KO doubly deficient mice reduced aortic plaque formation and cell proliferation in brachiocephalic plaques, but also markedly reduced apoptosis. Collectively, these studies demonstrate site specificity in the effects of p53 on atheroma progression and on proliferation and apoptosis within the lesion. In contrast to what might have been expected from all the studies mentioned, the size of diet-induced and spontaneously formed aortic atheromas was not attenuated in Super-p53/apoE-KO as compared to apoE-KO mice (Fig. 2). Moreover, cell proliferation and apoptosis in established aortic atheromas were not affected by heightening p53 function (Fig. 4A, B).

In contrast to our findings in the atherosclerosis model, Super-p53 mice are significantly protected from cancer<sup>12</sup> and from mechanically-induced neointimal thickening (Fig. 3). Furthermore, transient p53 overexpression limited neointimal hyperplasia in balloon-injured carotid artery<sup>29,30</sup>. Thus, gain of p53 function attenuates the progression of highly proliferative disorders (e.g., cancer and mechanically-induced neointimal hyperplasia), yet it appears ineffective against atherosclerosis, a disease characterized by much lower proliferative activity compared with restenosis<sup>7</sup>. It is also noteworthy that p53 inactivation in apoE-KO mice does not affect macrophage lipid accumulation<sup>24</sup>, an early event in atherosclerosis. It remains to be determined whether p53 regulates

additional cellular processes known to participate in the pathogenesis of atherosclerosis (e.g., leukocyte recruitment, extracellular matrix formation, production of pro- and anti-inflammatory cytokines and chemokines).

The role of p53 in plaque stability also remains uncertain. Compared to wild-type marrow, transplantation of p53-deficient bone marrow into apoE\*3-Leiden<sup>22</sup> or LDLR-KO<sup>23</sup> mice led to higher aortic necrotic index and diminished aortic neointimal collagen content, respectively, suggesting that endogenous macrophage p53 contributes to plaque stability. However, in apoE-KO mice, transluminal adenovirus-mediated p53 transfer into carotid atheromas induced by perivascular collar placement also led to more vulnerable plaques, as revealed by lower collagen content<sup>33</sup>. We found a tendency toward diminished collagen content in neointimal lesions of Super-p53/apoE-KO mice, in both aortic atherosclerosis and mechanically-injured femoral artery models (Fig. 6).

In summary, we have demonstrated that, in the absence of undesirable effects, increased p53 gene dosage in apoE-KO mice reduces neointimal thickening induced by mechanical vessel denudation. In contrast, this genetic manipulation did not affect atherosclerosis within the ascending aorta, aortic arch and thoracic aorta, and caused only a modest (22%) reduction in the highly atherogenic aortic root. Moreover, extra p53 function seems to promote lesion instability. Thus, while p53 gene transfer might be effective at limiting restenosis, its efficacy at attenuating native atherosclerosis is doubtful. It remains to be determined whether gain of p53 function beyond that achieved in Super-p53/apoE-KO would yield atheroprotection. This could be achieved generating apoE-KO mice carrying two or more additional p53 alleles, or using pharmacological inhibitors of the Mdm2/p53 interaction, such as the “AP peptide”, Nutlins, RITA, and inhibitors of the E3 ubiquitin ligase activity of Mdm2, a negative regulator of p53 that can both prevent effective p53-dependent transcriptional activation and target it for proteasomal degradation<sup>43</sup>. However, it should be noted that transgenic mice with hyperactivated p53, or its naturally occurring N-terminal truncated isoform p44, have aged prematurely (e.g., exhibit reduced longevity, osteoporosis, generalized organ atrophy and a diminished stress tolerance)<sup>13,14</sup>, perhaps because the p53 in these mice has an altered transcriptional program rather than an overall increase in activity<sup>43</sup>. Thus, given that prevention of human atherosclerosis requires chronic treatment, premature ageing as a consequence of imbalanced p53 activity might preclude its therapeutic use even if proven effective at limiting experimental atherosclerosis.

## Acknowledgements

We thank Naomi Konu and Lourdes Osuna for assistance with immunohistochemistry, María J. Andrés-Manzano for help with tissue sectioning and the preparation of figures, and Magda Heras for critical reading of the manuscript. Work financed by grants from Instituto de Salud Carlos III (Red de Centros RECAVA, C03/01), from the Regional Government of Valencia (GV04B-288) and from the Spanish Ministry of Education and Science and the European Regional Development Fund (SAF2004-03057). S.M.S.-G. was supported by a fellowship from Instituto de Salud Carlos III.

## REFERENCES

1. Libby P, Tanaka H. The molecular basis of restenosis. *Prog Cardiovasc Dis.* 1997;40:97-106.
2. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature.* 2000;407:233-41.
3. Greaves DR, Channon KM. Inflammation and immune responses in atherosclerosis. *Trends Immunol.* 2002;23:535-541.
4. Binder CJ, Chang MK, Shaw PX, Miller YI, Hartvigsen K, Dewan A, Witztum JL. Innate and acquired immunity in atherogenesis. *Nat Med.* 2002;8:1218-1226.
5. Sartore S, Chiavegato A, Faggini E, Franch R, Puato M, Ausoni S, Pauletto P. Contribution of adventitial fibroblasts to neointima formation and vascular remodeling: from innocent bystander to active participant. *Circ Res.* 2001;89:1111-1121.
6. Dzau VJ, Braun-Dullaeus RC, Sedding DG. Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies. *Nat Med.* 2002;8:1249-56.
7. Andrés V. Control of vascular cell proliferation and migration by cyclin-dependent kinase signalling: new perspectives and therapeutic potential. *Cardiovasc Res.* 2004;63:11-21.
8. Walsh K, Smith RC, Kim HS. Vascular cell apoptosis in remodeling, restenosis, and plaque rupture. *Circ Res.* 2000;87:184-8.
9. Sherr CJ. Tumor surveillance via the ARF-p53 pathway. *Genes Dev.* 1998;12:2984-2991.
10. Ryan KM, Phillips AC, Vousden KH. Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Curr Opin Cell Biol.* 2001;13:332-337.
11. Vousden KH, Lu X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer.* 2002;2:594-604.

12. García-Cao I, García-Cao M, Martín-Caballero J, Criado LM, Klatt P, Flores JM, Weill JC, Blasco MA, Serrano M. "Super p53" mice exhibit enhanced DNA damage response, are tumor resistant and age normally. *Embo J*. 2002;21:6225-35.
13. Tyner SD, Venkatachalam S, Choi J, Jones S, Ghebranious N, Igelmann H, Lu X, Soron G, Cooper B, Brayton C, Hee Park S, Thompson T, Karsenty G, Bradley A, Donehower LA. p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature*. 2002;415:45-53.
14. Maier B, Gluba W, Bernier B, Turner T, Mohammad K, Guise T, Sutherland A, Thorner M, Scrabble H. Modulation of mammalian life span by the short isoform of p53. *Genes Dev*. 2004;18:306-319.
15. Scott S, O'Sullivan M, Hafizi S, Shapiro LM, Bennett MR. Human vascular smooth muscle cells from restenosis or in-stent stenosis sites demonstrate enhanced responses to p53: implications for brachytherapy and drug treatment for restenosis. *Circ Res*. 2002;90:398-404.
16. Speir E, Modali R, Huang ES, Leon MB, Shawl F, Finkel T, Epstein SE. Potential role of human cytomegalovirus and p53 interaction in coronary restenosis. *Science*. 1994;265:391-394.
17. Zhou YF, Leon MB, Waclawiw MA, Popma JJ, Yu ZX, Finkel T, Epstein SE. Association between prior cytomegalovirus infection and the risk of restenosis after coronary atherectomy. *N Engl J Med*. 1996;335:624-630.
18. Iacopetta B, Wysocki S, Norman P, House A. The p53 tumor suppressor gene is overexpressed but not mutated in human atherosclerotic tissue. *Int J Oncol*. 1995;7:399-402.
19. Ihling C, Menzel G, Wellens E, Monting JS, Schaefer HE, Zeiher AM. Topographical association between the cyclin-dependent kinases inhibitor P21, p53 accumulation, and cellular proliferation in human atherosclerotic tissue. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17:2218-24.
20. Ihling C, Haendeler J, Menzel G, Hess RD, Fraedrich G, Schaefer HE, Zeiher AM. Co-expression of p53 and MDM2 in human atherosclerosis: implications for the regulation of cellularity of atherosclerotic lesions. *J Pathol*. 1998;185:303-312.
21. Guevara NV, Kim HS, Antonova EI, Chan L. The absence of p53 accelerates atherosclerosis by increasing cell proliferation in vivo. *Nat Med*. 1999;5:335-9.
22. van Vlijmen BJ, Gerritsen G, Franken AL, Boesten LS, Kockx MM, Gijbels MJ, Vierboom MP, van Eck M, van De Water B, van Berkel TJ, Havekes LM. Macrophage p53 deficiency leads to enhanced atherosclerosis in APOE\*3-Leiden transgenic mice. *Circ Res*. 2001;88:780-6.
23. Merched AJ, Williams E, Chan L. Macrophage-specific p53 expression plays a crucial role in atherosclerosis development and plaque remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:1608-14.



24. Mercer J, Figg N, Stoneman V, Braganza D, Bennett MR. Endogenous p53 protects vascular smooth muscle cells from apoptosis and reduces atherosclerosis in ApoE knockout mice. *Circ Res.* 2005;96:667-74.

25. Mayr U, Mayr M, Li C, Wernig F, Dietrich H, Hu Y, Xu Q. Loss of p53 accelerates neointimal lesions of vein bypass grafts in mice. *Circ Res.* 2002;90:197-204.

26. Moroi M, Izumida T, Morita T, Tatebe J, Ishii C, Imai T, Yagi S, Yamaguchi T, Katayama S. Effect of p53 deficiency on external vascular cuff-induced neointima formation. *Circ J.* 2003;67:149-153.

27. Sata M, Tanaka K, Ishizaka N, Hirata Y, Nagai R. Absence of p53 leads to accelerated neointimal hyperplasia after vascular injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:1548-1552.

28. Matsushita H, Morishita R, Aoki M, Tomita N, Taniyama Y, Nakagami H, Shimozato T, Higaki J, Kaneda Y, Ogihara T. Transfection of antisense p53 tumor suppressor gene oligodeoxynucleotides into rat carotid artery results in abnormal growth of vascular smooth muscle cells. *Circulation.* 2000;101:1447-1452.

29. Yonemitsu Y, Kaneda Y, Tanaka S, Nakashima Y, Komori K, Sugimachi K, Sueishi K. Transfer of wild-type p53 gene effectively inhibits vascular smooth muscle cell proliferation in vitro and in vivo. *Circ Res.* 1998;82:147-156.

30. Scheinman M, Ascher E, Levi GS, Hingorani A, Shirazian D, Seth P. p53 gene transfer to the injured rat carotid artery decreases neointimal formation. *J Vasc Surg.* 1999;29:360-369.

31. Wan S, George SJ, Nicklin SA, Yim AP, Baker AH. Overexpression of p53 increases lumen size and blocks neointima formation in porcine interposition vein grafts. *Mol Ther.* 2004;9:689-98.

32. George SJ, Angelini GD, Capogrossi MC, Baker AH. Wild-type p53 gene transfer inhibits neointima formation in human saphenous vein by modulation of smooth muscle cell migration and induction of apoptosis. *Gene Ther.* 2001;8:668-676.

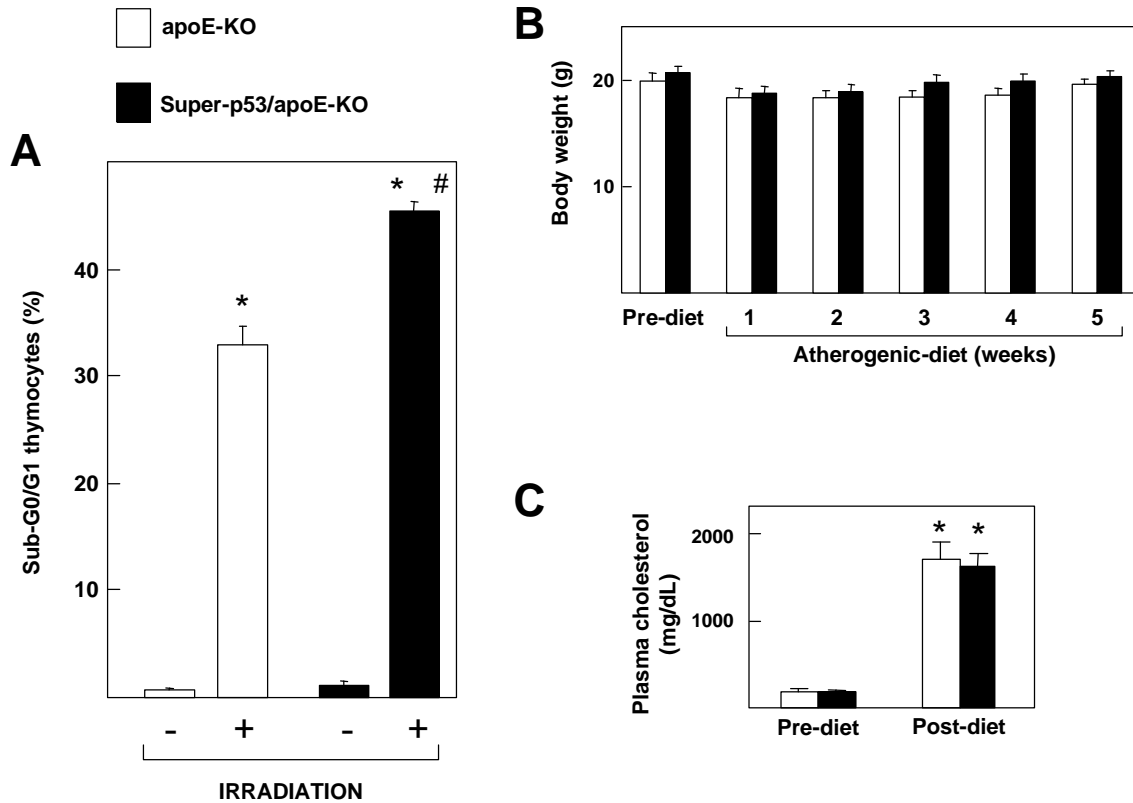
33. von der Thüsen JH, van Vlijmen BJ, Hoeben RC, Kockx MM, Havekes LM, van Berkel TJ, Biessen EA. Induction of atherosclerotic plaque rupture in apolipoprotein E<sup>-/-</sup> mice after adenovirus-mediated transfer of p53. *Circulation.* 2002;105:2064-2070.

34. Meir KS, Leitersdorf E. Atherosclerosis in the apolipoprotein E-deficient mouse: a decade of progress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:1006-14.

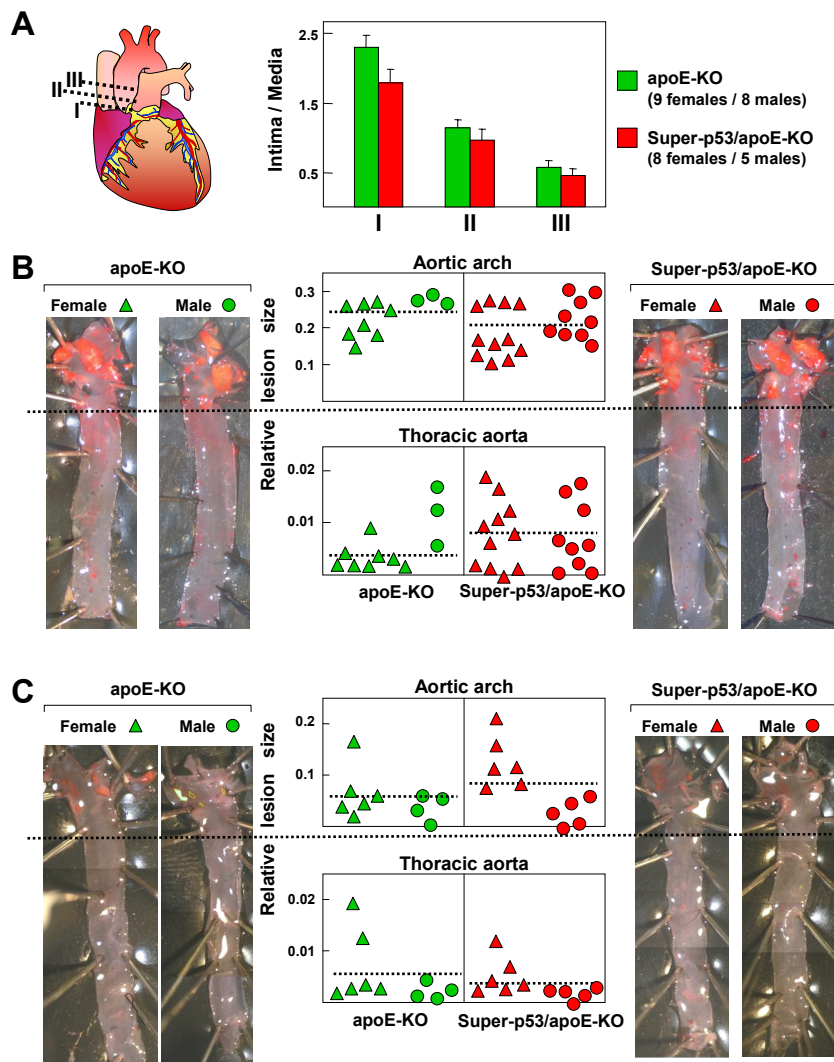
35. Tan MH, Sun Z, Opitz SL, Schmidt TE, Peters JH, George EL. Deletion of the alternatively spliced fibronectin EIIIA domain in mice reduces atherosclerosis. *Blood.* 2004;104:11-8.

36. Díez-Juan A, Andrés V. The growth suppressor p27<sup>Kip1</sup> protects against diet-induced atherosclerosis. *Faseb J.* 2001;15:1989-1995.

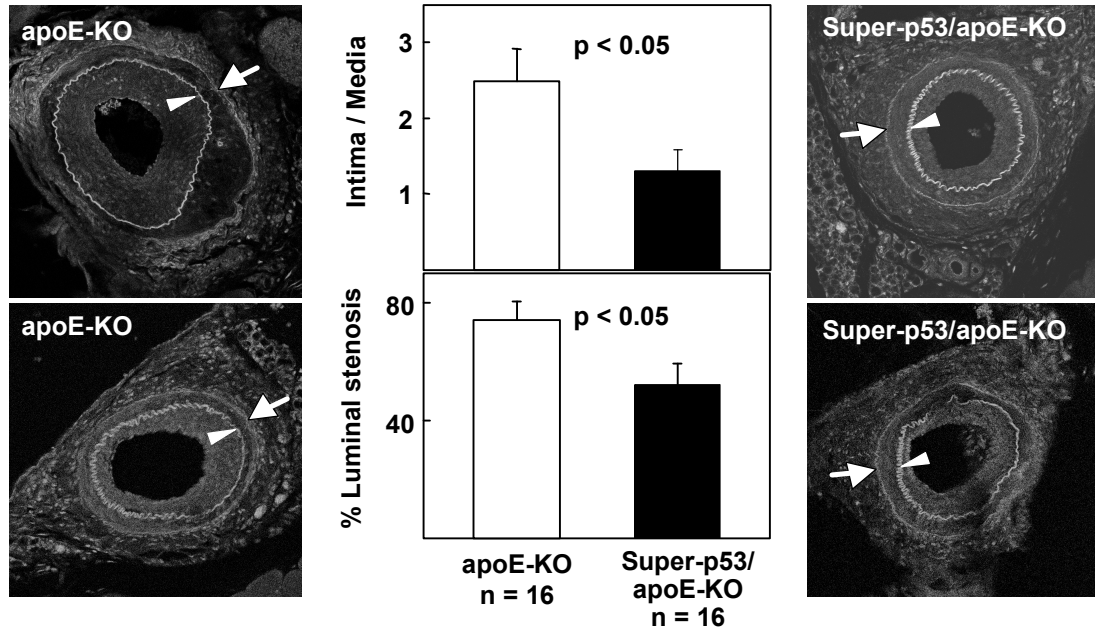
37. Roqué M, Fallon JT, Badimon JJ, Zhang WX, Taubman MB, Reis ED. Mouse model of femoral artery denudation injury associated with the rapid accumulation of adhesion molecules on the luminal surface and recruitment of neutrophils. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:335-42.
38. Briones AM, González JM, Somoza B, Giraldo J, Daly CJ, Vila E, González MC, McGrath JC, Arribas SM. Role of elastin in spontaneously hypertensive rat small mesenteric artery remodeling. *J Physiol.* 2003;552:185-95.
39. Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science.* 1992;258:468-71.
40. Cullen P, Baetta R, Bellosta S, Bernini F, Chinetti G, Cignarella A, von Eckardstein A, Exley A, Goddard M, Hofker M, Hurt-Camejo E, Kanters E, Kovanen P, Lorkowski S, McPheat W, Pentikainen M, Rauterberg J, Ritchie A, Staels B, Weitkamp B, de Winther M. Rupture of the atherosclerotic plaque: does a good animal model exist? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:535-542.
41. Scheinman M, Ascher E, Kallakuri S, Hingorani A, Gade P, Sherman M, Seth P, Jacob T. p53 gene transfer to the injured rat carotid artery promotes apoptosis. *Surgery.* 1999;126:863-868.
42. 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;8:403-409.
43. Poyurovsky MV, Prives C. Unleashing the power of p53: lessons from mice and men. *Genes Dev.* 2006;20:125-131.



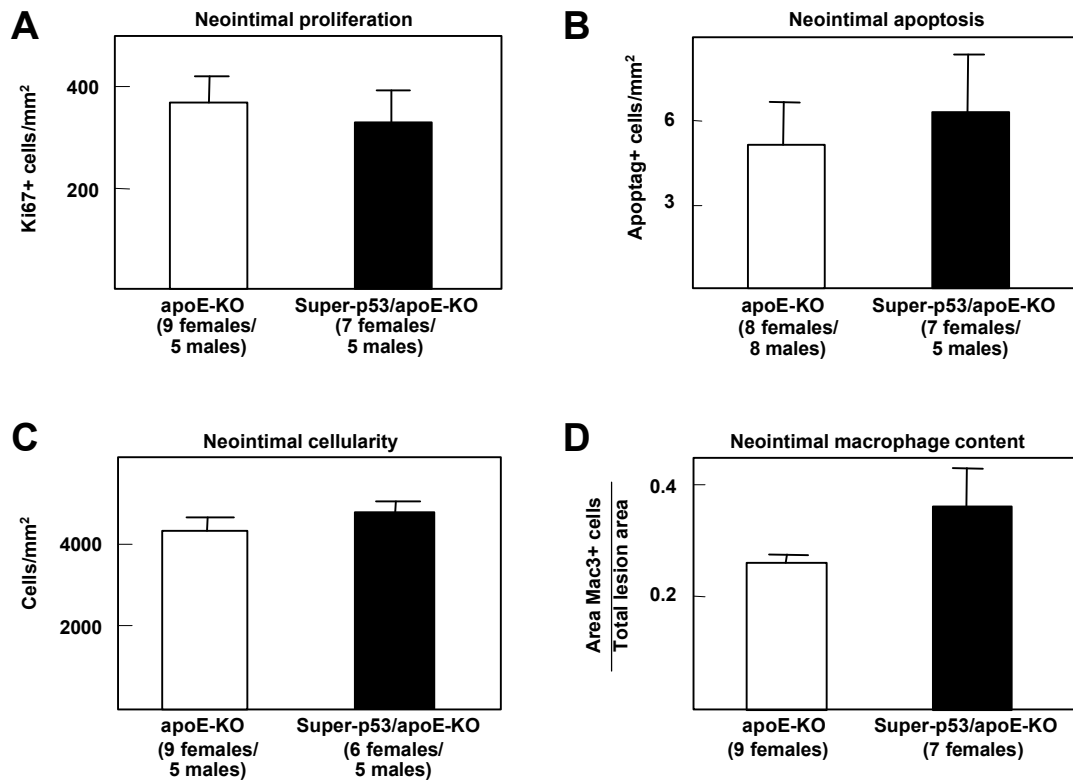
**FIG. 1: Characterization of Super-p53/apoE-KO mice.** Results represent the mean±SE of 2 mice of each genotype (2-month-old fed control chow). Differences among groups were analyzed by ANOVA and Fisher's *post-hoc* test. **(A)** Super-p53/apoE-KO mice exhibit enhanced p53 function, as shown by the higher percentage of apoptotic thymocytes upon whole body irradiation. Thymocytes were isolated from non-irradiated and whole-body irradiated mice and apoptosis was estimated by flow cytometry as the percentage of cells with sub-G0/G1 DNA content. \*,  $p < 0.0001$  versus non-irradiated same genotype; #,  $p < 0.0001$  versus irradiated apoE-KO mice. **(B, C)** Two-month-old mice received the atherogenic diet for 5 wks and were weighed on a weekly basis. For body weight **(B)**, 8 females/4 males apoE-KO and 11 females/9 males Super-p53/apoE-KO mice were analyzed. Plasma cholesterol **(C)** increased significantly in both groups of fat-fed mice compared with pre-diet values (3 females/3 males each genotype; \*,  $p < 0.0001$  vs. pre-diet same genotype). No statistically significant differences were observed in plasma cholesterol and body weight when comparing mice of both genotypes.



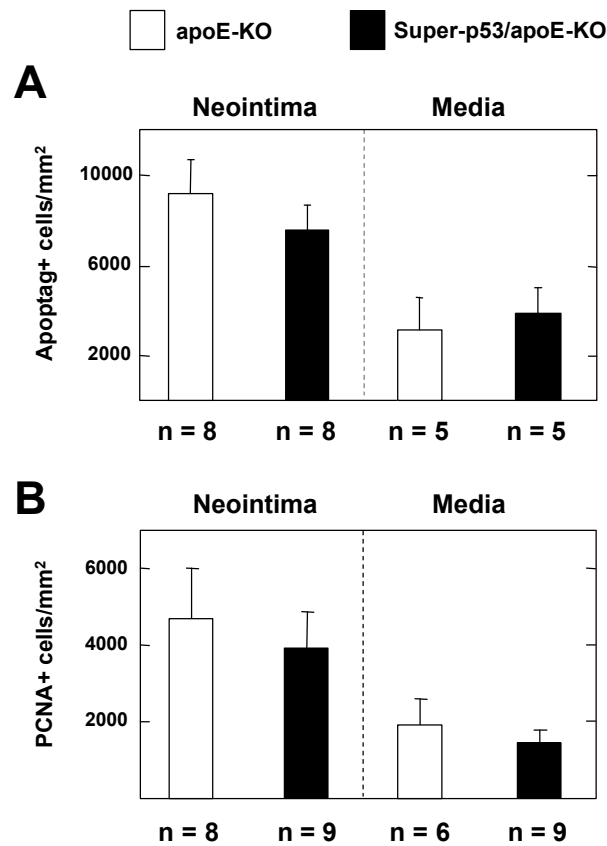
**FIG. 2: Gain of p53 function does not affect the size of diet-induced and spontaneously formed atherosclerotic lesions.** Diet-induced (A, B) and spontaneous (C) atherosclerosis was quantified in mice receiving the atherogenic diet and standard chow, respectively. Gender distribution is indicated. Planimetric analysis was carried out by an operator who was blinded to genotype. Results represent the mean  $\pm$  SE. Differences between genotypes did not reach statistical significance as evaluated using two-tail, unpaired Student t test ( $p > 0.05$ ). (A) Two month-old mice received the atherogenic diet for 5 wks and atherosclerosis was quantified as the I/M ratio in hematoxylin/eosin-stained cross-sections from three different regions of the ascending aorta starting close to the aortic valve and separated by approximately 30  $\mu$ m (I – aortic root -, II, III). (B) Two month-old mice received the atherogenic diet for 7 wks and atherosclerosis in the aortic arch and thoracic aorta was quantified in whole mounted aorta stained with Oil Red O as the ratio of total lesion area (red staining) versus total area. (C) Spontaneous atherosclerosis in 6-month-old mice was quantified as in B. A representative aorta from each gender and genotype is shown in B and C. The discontinuous black line marks the separation between the aortic arch and the thoracic aorta. The red line in the graphs indicates the mean relative lesion size for each experimental group.



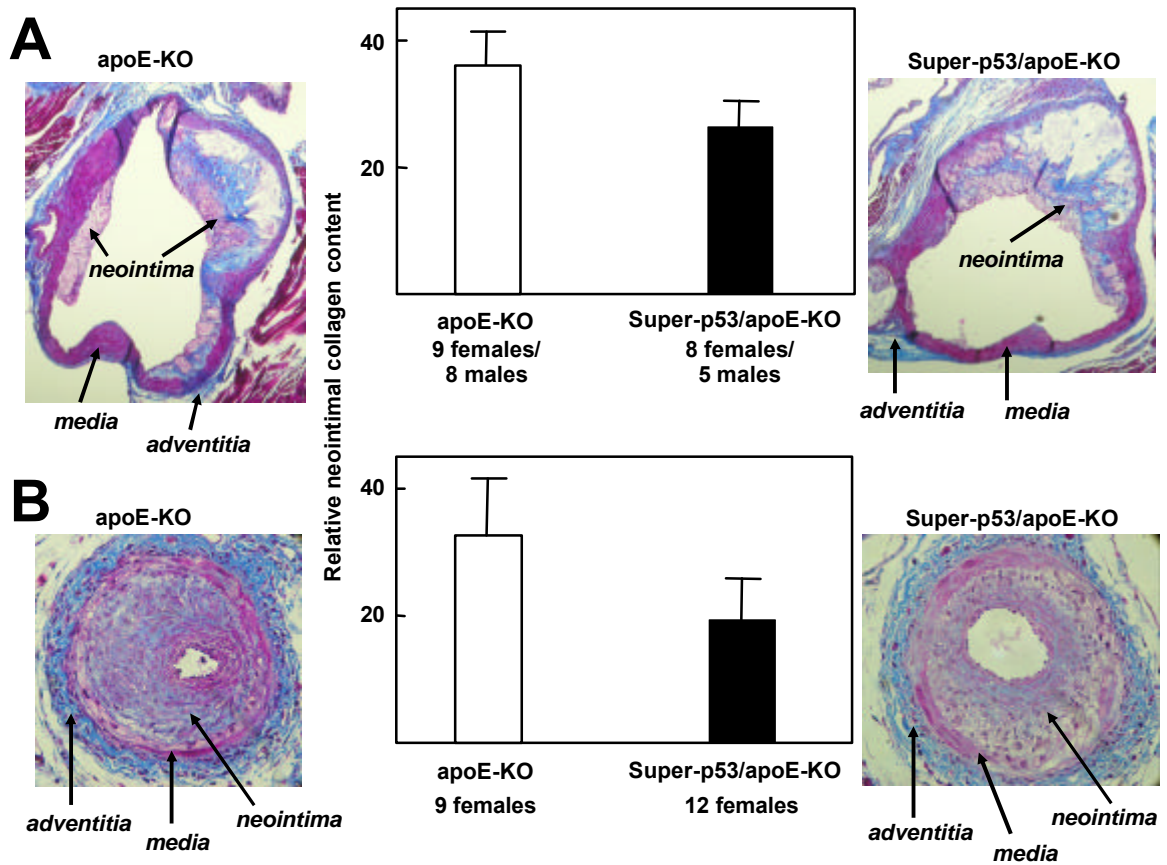
**FIG. 3: Gain of p53 function reduces neointimal thickening in mechanically-injured femoral arteries.** Female 4-5-month-old mice underwent bilateral endoluminal injury to the common femoral artery and were sacrificed 4 wks after surgery. Images of femoral artery cross-sections were captured with a confocal microscope to determine the I/M ratio and percentage of luminal stenosis. Planimetric analysis was carried out by an operator who was blinded to genotype. Only sections showing both the external (arrow) and internal (arrowhead) elastic lamina were analyzed. Results represent the mean $\pm$ SE. Differences between genotypes were evaluated using two-tail, unpaired Student t test. The photomicrographs show representative arteries of each genotype.



**FIG. 4: Gain of p53 function does not affect proliferation, apoptosis, cellularity, and macrophage content in aortic atheromas induced by high-fat feeding.** Mice were challenged with the atherogenic diet for 7 wks. Studies were carried out in cross-sections from region I of the ascending aorta (see Fig. 2A). Gender distribution is indicated. **(A)** Cellular proliferation, estimated as Ki67 immunoreactivity. **(B)** Apoptosis, as determined with the Apoptag kit. **(C)** Lesion cellularity. **(D)** Macrophage content, determined as Mac-3 immunoreactivity. Results represent mean $\pm$ SE. Differences between genotypes did not reach statistical significance ( $p>0.05$ , two-tail, unpaired Student t test).



**FIG. 5: Extra p53 dosage does not affect proliferation and apoptosis in mechanically-injured femoral artery.** Female mice of the indicated genotypes were subjected to femoral artery denudation and cross-sections were analyzed 4 wks after injury. Apoptosis (**A**) and proliferation (**B**) in neointima and media were assessed by Apoptag and PCNA-immunostaining, respectively. Results represent the mean ± SE. Differences between genotypes did not reach statistical significance ( $p > 0.05$ , two-tail, unpaired Student t test).



**FIG. 6: Collagen content in diet- and mechanically-induced neointimal lesions.** Cross-sections were stained with Masson Trichrome and relative neointimal collagen content (blue staining) was quantified in **(A)** aortic atheromas induced by 7 wks of fat feeding, and **(B)** in mechanically-injured femoral arteries (4 wks post-injury) (see Materials and methods for details). Results represent the mean $\pm$ SE. Although differences between groups did not reach statistical significance, as determined by unpaired Student t test, a tendency towards reduced collagen content is observed in Super-p53/apoE-KO mice.



**CAPÍTULO 4**

**RESUMEN**  
**Y**  
**DISCUSIÓN GENERAL**



El trabajo de esta Tesis Doctoral se ha centrado en la elucidación de mecanismos moleculares implicados en el control de la proliferación celular, con especial énfasis en CMLVs en cultivo y modelos animales de aterosclerosis y daño vascular mecánico. El abordaje general ha consistido en la utilización de fármacos antiproliferativos y la generación y caracterización de ratones modificados genéticamente en los que se ha alterado la expresión/función de genes reguladores del ciclo celular.

**Los estudios realizados se plantearon para responder a las siguientes preguntas:**

1) ¿Cuál es el mecanismo molecular por el que PCA-4230 y STI571 inhiben la proliferación de CMLVs y células cancerosas? (**Trabajo 1 y Trabajo 2**).

2) ¿Es importante la fosforilación de p27<sup>Kip1</sup> en la T187, implicada en su degradación en fase S por la vía del proteosoma, en la progresión del ateroma inducido por dieta rica en grasa y colesterol? (**Trabajo 3**)

3) ¿La ganancia de función de p53 previene el desarrollo de la placa de ateroma en un modelo de aterosclerosis experimental? ¿Protege frente al desarrollo de la neointima tras daño mecánico en la arteria femoral de ratones deficientes en apolipoproteína E? (**Trabajo 4**).

### **PCA-4230 inhibe la proliferación celular como consecuencia del bloqueo de la ruta ciclina D1/E2F**

Una característica que comparten cáncer y arteriosclerosis es una proliferación celular excesiva. Mientras que el cáncer se caracteriza por una proliferación acelerada, desordenada e incontrolada de las células de un tejido que invaden, desplazan y destruyen, localmente y a distancia, otros tejidos sanos del organismo, en la arteriosclerosis la proliferación anormal de CMLVs y macrófagos ocurre a nivel local en la placa de ateroma (Ross et al., 2001). A pesar de estas diferencias, la inhibición de la proliferación celular es una estrategia terapéutica utilizada en clínica para combatir ambas patologías.

En este estudio examinamos el mecanismo molecular por el que el fármaco PCA-4230 produce la inhibición de la proliferación celular. Trabajos previos habían demostrado que este derivado de las dihidropirimidinas, de fórmula química 2(1, 1, 3-trioxo-2, 3-dihidro-1, 2-

bencisotia-zol-2-il) etil 2, 6-dimetil-5-(etoxicarbonil)-4-metil-1, 4-dihidropiridincarboxilato, es capaz de inhibir la agregación plaquetaria y la trombosis (Gutiérrez Díaz et al., 1992; Ortega et al., 1993; Sunkel et al., 1988), dos importantes procesos en la etiopatogénesis de los procesos isquémicos agudos (por ejemplo, infarto de miocardio y embolia cerebral). Además, ensayos *in vitro* con CMLVs demostraron como la proliferación resultaba inhibida en presencia del fármaco a nivel de G0/G1 debido a una reducción en los niveles de ARN mensajero de los factores de transcripción c-fos y c-jun, importantes durante el proceso proliferativo (del Río et al., 1997).

Nuestros resultados demuestran que PCA-4230 produce una potente inhibición en la entrada en fase S de CMLVs, tanto de rata como humanas, tras ayuno y reestimulación (**figura 1B, 1C, trabajo 1, pág. 45**), además de inhibir eficientemente la proliferación de células transformadas (U2OS, MCF7, MEF-Myc) (**figura 2, trabajo 1, pág. 46**). Los mecanismos responsables del efecto citostático del PCA-4230 incluyen: a) inhibición de la expresión de la ciclina D1 y ciclina A (**figura 4A, trabajo 1, pág. 47**), b) inhibición de la actividad quinasa de CDK2 (**figura 3A, trabajo 1, pág. 46**) y bloqueo de la fosforilación de la proteína Rb (**figura 4A, trabajo 1, pág. 47**), c) represión transcripcional de la ciclina A (**figura 5, trabajo 1, pág. 48**). Sin embargo, el PCA-4230 no tiene efecto sobre los niveles proteicos de ciclina E ni CDK2 (**figura 4A, trabajo 1, pág. 47**), ni tampoco sobre la actividad PI3K (**figura 3B, trabajo 1, pág. 46**).

Comprobamos que el efecto inhibitorio de PCA-4230 no era debido a una interacción directa con la quinasa CDK2, pues la adición directa del fármaco a la reacción quinasa no fue capaz de inhibir la actividad CDK2 (resultado no mostrado). Consideramos también la posibilidad de que miembros de la familia de CKIs pudieran contribuir a la parada de ciclo dependiente de PCA-4230. Sin embargo, no observamos aumento de la expresión de las CKIs p21<sup>Cip1/WAF1</sup> ni p27<sup>Kip1</sup> en células tratadas con PCA-4230 (**figura 4C, 4D, trabajo 1, pág. 47**).

La compleja interacción entre la proteína Rb y los miembros de la familia de los factores de transcripción E2F juega un papel importante en la regulación de la progresión del ciclo celular (Dyson, 1998; Graña and Reddy, 1995). Se acepta que la fosforilación de Rb por acción del holoenzima ciclina D1-CDK4/6 libera a E2F permitiendo la activación transcripcional de genes necesarios para la progresión en el ciclo, por lo que la inhibición de la ciclina D1 y de la actividad CDK2 podría estar implicada en el bloqueo de la hiperfosforilación de la proteína Rb en CMLVs reestimuladas con suero y tratadas con PCA-4230. La acumulación de Rb hipofosforilado impediría a su vez la activación transcripcional de la ciclina A y, por tanto, la formación de holoenzimas

activos ciclina A-CDK2. Es este sentido, nuestro grupo había demostrado que E2F es un componente importante en la cascada de señalización dependiente de Ras que activa la transcripción de ciclina A en CMLVs (Sylvester et al., 1998). Dado que la eliminación de la función de la ciclina A inhibe la entrada en fase S (Girard et al., 1991; Pagano et al., 1992; Zindy et al., 1992) y su sobreexpresión acelera la transición G1/S, (Resnitzky et al., 1995; Rosenberg et al., 1995) **nuestros resultados sugieren que la represión transcripcional del gen de la ciclina A puede contribuir al mecanismo por el que PCA-4230 ejerce su efecto inhibitorio en las CMLVs.**

Para averiguar si el PCA-4230 inhibe la expresión de la ciclina A y la proliferación de las CMLVs a través de la inhibición de la ruta ciclina D1/E2F, realizamos experimentos de rescate, sobreexpresando bien ciclina D1 o E2F. Nuestros resultados demuestran que la sobreexpresión ectópica de estas proteínas rescata eficazmente el efecto inhibitorio del PCA-4230 sobre la actividad del promotor de la ciclina A (**figura 6, trabajo 1, pág. 48**). Además, la sobreexpresión de E2F restauraba la síntesis de DNA en CMLVs tratadas con PCA-4230 (**figura 7, trabajo 1, pág. 49**). Estos resultados sugieren que el PCA-4230 reprime la activación del promotor de la ciclina A y la proliferación celular mediante la inhibición de la ruta ciclina D1/E2F.

**En resumen, nuestros estudios *in vitro* demuestran que la inhibición de la ruta ciclina D1/E2F por el fármaco PCA-4230 es efectiva en la supresión de la proliferación de CMLVs y células cancerosas.** Si bien el tratamiento con PCA-4230 ha sido tolerado por voluntarios sanos en ensayos clínicos de Fase I (Cillero et al., 1991), se requieren estudios adicionales para valorar si el PCA-4230 puede utilizarse con seguridad y eficazmente para el tratamiento de enfermedades hiperproliferativas, como son la enfermedad cardiovascular y el cáncer.

### **El fármaco STI571 provoca la parada de ciclo celular y la represión transcripcional de la ciclina A en CMLVs debido a un bloqueo de la actividad de ERK1/2 y E2F**

El factor de crecimiento derivado de plaquetas PDGF-BB es un potente mitógeno y quimioatrayente de las CMLVs, (Bornfeldt et al., 1994; Grotendorst et al., 1982; Ross et al., 1986) que interviene en la transformación fenotípica de estas células del estado contráctil al sintético característica del desarrollo de la lesión neoíntima (Sjolund et al., 1990). El receptor de PDGF se dimeriza cuando se produce la unión de PDGF-BB, lo cual provoca la estimulación de la actividad tirosín kinasa del mismo, iniciándose la cascada de señalización que culmina en

la división celular (Escobedo et al., 1988; Heldin et al., 1989). Se ha demostrado que inhibidores de tirosín quinasa inhiben eficientemente la proliferación y la quimiotaxis celular (Bilder et al., 1991; Ito et al., 1995; Shimokado et al., 1994).

El derivado de la 2-fenilaminopiridina STI571 (también llamado imatinib y Gleevec) es un inhibidor de la actividad tirosín quinasa Abl, cuya eficacia terapéutica ha sido ampliamente demostrada en pacientes con leucemia mieloide crónica (Druker, 2002; Shawver et al., 2002). Además STI571 es un potente inhibidor de los receptores de los factores PDGF y de células troncales (SCF) y de c-Kit. El STI571 también ha demostrado efectividad en modelos animales de enfermedad cardiovascular, como la reestenosis post-angioplastia (Myllärniemi et al., 1999), la aterosclerosis inducida por dieta (Boucher et al., 2003) y la arteriosclerosis por trasplante (Sihvola et al., 2003). El STI571 también inhibe la angiogénesis *in vitro*, y este efecto angiostático se ha atribuido principalmente a su acción antiproliferativa y anitmigratoria sobre las CMLVs (Dudley et al., 2003). El CGP 53716, otro fármaco inhibidor de proteínas tirosín quinasa capaz de inhibir selectivamente la autofosforilación del receptor de PDFG, también atenúa el engrosamiento de la neointima en un modelo de angioplastia por balón en carótida de rata (Myllärniemi et al., 1997) y previene la arteriosclerosis cardiaca por injerto (Sihvola et al., 1999). Este efecto puede deberse, al menos en parte, a una inhibición del incremento del ARN mensajero del factor de transcripción c-fos (Buchdunger et al., 1995).

Los mecanismos moleculares por los que los inhibidores de proteínas tirosín quinasa ejercen sus efectos terapéuticos no están totalmente descifrados. Por ello, nos planteamos estudiar el efecto del STI571 sobre reguladores clave del ciclo celular y factores de transducción relacionados con proliferación y migración celular en CMLVs. De acuerdo con estudios previos, nuestros resultados demuestran que el STI571 inhibe la proliferación (**figura 1B, trabajo 2, pág. 57**) y la migración (resultados no mostrados) de CMLVs estimuladas con PDGF-BB. Además, el tratamiento con STI571 previene el aumento de la ciclina D1 y la ciclina A (**figura 2, trabajo 2, pág. 58**) y la activación de las ERKs 1/2 (**figura 5, trabajo 2, pág. 60**) que normalmente acontece en células estimuladas con PDGF-BB. Teniendo en cuenta que la activación de las ERKs1/2 es un proceso clave en la proliferación celular dependiente de PDGF-BB (Davis, 1993), **nuestros resultados sugieren que el bloqueo de su actividad es un mecanismo por el cual el STI 571 ejerce sus efectos inhibitorios sobre CMLVs estimuladas con PDGF-BB.**

Experimentos de transfección transitoria nos sugirieron que el efecto inhibitorio de STI571 sobre la expresión de la ciclina A está mediado, al

menos en parte, por la represión de la actividad transcripcional de su promotor (**figura 3, trabajo 2, pág. 58**). Trabajos previos de nuestro grupo y otros laboratorios demostraron que la unión de CREB/ATF y E2F a elementos *cis* del promotor de la ciclina A humana localizados en las posiciones -79/-72 y -37/-32, respectivamente, es esencial para la activación transcripcional del gen de la ciclina A (Barlat et al., 1995; Desdouets et al., 1995; Schulze et al., 1995; Sylvester et al., 1998; Yoshizumi et al., 1995). En este trabajo demostramos que mutaciones que eliminan el sitio de unión de E2F en el promotor de la ciclina A impiden su represión transcripcional mediada por el STI571 (**figura 3, trabajo 2, pág. 58**), y que la sobreexpresión ectópica de E2F rescata completamente este efecto inhibitorio (**figura 4, trabajo 2, pág. 59**). Por tanto, **demostramos que E2F es una diana crítica de STI571 en CMLVs**. Sin embargo, son necesarios más estudios para identificar los elementos localizados en *cis* dentro de la región -924 y -80 que son necesarios para la inhibición máxima observada en el promotor -924/+245 de la ciclina A (**figura 3, trabajo 2, pág. 58**).

Para averiguar si la inhibición de ERK1/2 por STI571 contribuye a reducir la actividad del promotor de la ciclina A, realizamos experimentos de transfección transitoria en FMCLVs infectadas con un vector retroviral que codifica para un mutante de MEK1 constitutivamente activo que provoca la activación de ERK 1/2. Nuestros resultados muestran que la represión inducida por STI571 en el promotor de la ciclina A está atenuada en estas células comparadas con células control infectadas con un retrovirus control que codifica para Lac-Z (**figura 6A, trabajo 2, pág. 60**). Además, la activación forzada de las ERKs en FCMLVs previene o atenua el efecto antiproliferativo de dosis bajas y altas de STI571, respectivamente (**figura 6B, trabajo 2, pág. 60**).

**En resumen, nuestros resultados sugieren que el efecto citostático que provoca el STI571 en CMLVs estimuladas con PDGF-BB depende del bloqueo de la actividad de ERK1/2 y del factor de transcripción E2F, con el subsiguiente bloqueo de la expresión de ciclina D1 y ciclina A.** Estudios de expresión génica comparando CMLVs control y tratadas con STI 571 (por ejemplo, mediante microarrays de cDNA), y experimentos de ganancia y pérdida de función permitirán en un futuro identificar factores reguladores adicionales implicados en las propiedades antiproliferativas de este fármaco.

**En resumen, los resultados de los trabajos 1 y 2 demuestran que la inhibición de E2F y la represión transcripcional de la ciclina A son parte del mecanismo molecular por el que PCA-4230 y STI571 inhiben la proliferación de CMLVs.** En cuanto a su posible aplicación terapéutica para el tratamiento de la aterosclerosis y reestenosis post-angioplastia, se ha demostrado que el PCA-4230 presenta propiedades antitrombóticas y antiagregantes (Gutiérrez Díaz et al., 1992). Además, el STI571 inhibe el desarrollo de lesiones vasculares obstructivas en modelos animales de angioplastia (Myllärniemi et al., 1999), aterosclerosis inducida por dieta (Boucher et al., 2003) y arteriosclerosis por trasplante (Sihvola et al., 2003), además de inhibir angiogénesis *in vitro* (Dudley et al., 2003).

### **El desarrollo de la placa de ateroma en ratones deficientes en apolipoproteína E no está regulado por la fosforilación de p27<sup>Kip1</sup> en la treonina 187**

La ruta proteolítica de degradación de p27<sup>Kip1</sup> en fase G1/S depende de la fosforilación en el residuo T187 por acción de ciclina E-CDK2, (Montagnoli et al., 1999; Morisaki et al., 1997; Sheaff et al., 1997; Vlach et al., 1997) evento que provoca la ubiquitinación de p27<sup>Kip1</sup> por el complejo SCK<sup>skp2</sup> y su posterior degradación en el proteasoma (Carrano et al., 1999; Montagnoli et al., 1999; Nakayama et al., 2004; Nakayama et al., 2001; Tsvetkov et al., 1999) (**figura 2** de la introducción, pág. 7).

Trabajos previos de nuestro grupo demostraron que p27<sup>Kip1</sup> inhibe la proliferación celular en la pared arterial y protege frente al desarrollo de arteriosclerosis en ratones deficientes en apoE alimentados con una dieta rica en grasa y colesterol (Díez-Juan and Andrés, 2001; Díez-Juan et al., 2004). Por otra parte, se ha demostrado que la expresión ectópica del mutante de p27<sup>Kip1</sup> no fosforilable en T187 conduce a su estabilización (Hurteau et al., 2002; Malek et al., 2001; Morisaki et al., 1997; Park et al., 2001). Con estos precedentes, nosotros especulamos que los ratones p27<sup>T187A</sup> deficientes en apoE podrían presentar una reducción en la aterosclerosis debido a la acumulación de p27<sup>Kip1</sup> en la pared arterial. Sin embargo, nuestros estudios demuestran que ambos parámetros son indistinguibles en ratones p27<sup>T187A</sup> deficientes en apoE comparados con controles apoE-KO con p27<sup>Kip1</sup> silvestre (**figuras 2 y 3, trabajo 3, pág. 69 y 70**). Del mismo modo, el análisis de las lesiones ateroscleróticas mostró que la pérdida de la fosforilación de p27<sup>Kip1</sup> en la T187 no afecta ni a la celularidad ni a las tasas de proliferación y apoptosis celular (**figura 4, trabajo 3, pág. 71**). Por tanto, niveles fisiológicos de p27<sup>T187A</sup> no afectan al curso de la aterosclerosis en ratones hipercolesterolémicos. En este sentido, cabe destacar que Park y



colaboradores han demostrado que la sobreexpresión de una proteína mutante más estable, p27<sup>T187M/P188I</sup>, en la que el residuo T187 está mutado a metionina y el residuo de prolina 188 a una isoleucina, induce en células cancerosas una fuerte parada en la transición G1/S y mayor apoptosis que células que sobreexpresan p27<sup>Kip1</sup> silvestre (Park et al., 2001). Además, la inyección intratumoral de adenovirus que codifican para p27<sup>T187M/P188I</sup> induce la regresión parcial de tumores establecidos e inhibe el crecimiento de xenotrasplantes de cáncer de pulmón humanos más eficazmente que adenovirus que codifican para p27<sup>Kip1</sup> silvestre. Sería pues interesante investigar si niveles suprafisiológicos de p27<sup>T187A</sup> o p27<sup>T187M/P188I</sup> inhiben la aterosclerosis inducida por dieta.

Confirmamos que el peso corporal de los ratones p27<sup>T187A</sup> deficientes en apoE es mayor en comparación con sus hermanos apoE deficientes con p27<sup>Kip1</sup> silvestre (**figura 1A, trabajo 3, pág. 69**), mientras, los niveles de colesterol plasmático tal y como esperábamos, están muy elevados al mes de la dieta aterogénica pero son indistinguibles entre genotipos (**figura 1B, trabajo 3 pág. 69**).

Estudios previos con MEFs aisladas de ratones p27<sup>T187A</sup> habían mostrado que p27<sup>Kip1</sup> es degradado al menos por dos rutas proteolíticas diferentes, que actúan con posterioridad durante la fase G1 (Malek et al., 2001). La segunda ruta, que opera durante la transición G1/S, estaba bloqueada en los MEFs p27<sup>T187A</sup>, que presentaban niveles elevados de p27<sup>T187A</sup> durante las fases restantes del ciclo celular. Sin embargo, cada vez es más evidente que las consecuencias de expresar p27<sup>T187A</sup> difieren según el tipo celular, tejido y condiciones patofisiológicas. Por ejemplo, *in vitro*, la proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> esplénicos portadores de p27<sup>T187A</sup> se redujo un 80% en comparación con los aislados de ratones silvestres, mientras que la proliferación de los MEFs portadores de p27<sup>Kip1</sup> no fosforilable sólo se redujo en un 20-30%, mientras que la proliferación de timocitos no resultó afectada por esta mutación (Malek et al., 2001). En nuestros estudios, comprobamos que la proliferación de esplenocitos aislados de ratones p27<sup>T187A</sup> deficientes en apoE era menor que la de esplenocitos aislados de ratones deficientes en apoE (resultados no mostrados).

Los efectos del mutante p27<sup>T187A</sup> se han estudiado también *in vivo* en dos modelos distintos. En el estudio de la cicatrización de la herida provocada por punción circular en la piel, que es un proceso que depende principalmente de la proliferación de células epiteliales, se observó que ésta estaba retrasada en los ratones p27<sup>T187A</sup>, correlacionándose esta demora con una menor incorporación de BrdU

en los queratinocitos del borde de la herida (13, 5% en ratones p27<sup>T187A</sup> vs 35% en los ratones silvestres). Sin embargo, en el modelo de herida por incisión, en el que la curación ocurre mayoritariamente por migración de células epiteliales, el cierre de las lesiones fue similar en ratones silvestres y p27<sup>T187A</sup> (Malek et al., 2001). Por otro lado, la regeneración del hígado tras hepatectomía parcial en ratones p27<sup>T187A</sup> alargó la fase G2 en comparación con ratones silvestres, aunque este fenómeno no estuvo acompañado de perturbaciones en el inicio o duración de la fase S en hepatocitos (Kossatz et al., 2004). Tampoco se observó en los hepatocitos de ratones p27<sup>T187A</sup> una parada del ciclo celular en mitosis, ni cambios en la ploidía o tamaño celular.

**Nuestros resultados en el modelo de arteriosclerosis experimental refuerzan el concepto de que el efecto de la fosforilación de p27<sup>Kip1</sup> en T187 sobre el nivel de expresión proteica de p27<sup>Kip1</sup> y la regulación del ciclo celular varía en diferentes tipos celulares, tejidos y condiciones patofisiológicas, tanto *in vitro* como *in vivo*.** Sin embargo queda por demostrar si existen mecanismos alternativos de degradación de p27<sup>Kip1</sup> que puedan operar y compensar la pérdida de la fosforilación en T187 en ratones p27<sup>T187A</sup> deficientes en apoE. De hecho, se ha sugerido que KPC y Skp2 podrían ser funcionalmente redundantes (Nakayama et al., 2000). Además, dado que los niveles de expresión de la proteína p27<sup>Kip1</sup> en el ratón “knock-in” p27<sup>S10A</sup> también muestran diferencias tejido específicas (expresión reducida en cerebro, bazo, testículos, y niveles invariables en hígado, corazón, pulmón y músculo esquelético) (Kotake et al., 2005), son necesarios estudios adicionales para analizar las cinéticas de aterosclerosis en ratones portadores de la mutación p27<sup>S10A</sup>, así como en dobles mutantes p27<sup>S10A</sup>-T187A. Recientemente, se ha demostrado que los ratones p27<sup>S10A</sup> son menos susceptibles al desarrollo de tumores de pulmón que ratones heretocigotos o globalmente deficientes en p27<sup>Kip1</sup> (Besson et al., 2006).

**La ganancia de función p53 en ratones deficientes en apolipoproteína E reduce la hiperplasia de la neoíntima tras denudación mecánica, pero no afecta al desarrollo de la placa de ateroma**

Se ha demostrado que la disminución de los niveles de p53 precede a la migración y proliferación de CMLVs de explantes arteriales tratados con mitógenos (Rodríguez-Campos et al., 2001). Además, la sobreexpresión y la inactivación de p53 en cultivos de CMLVs inhibe y

aumenta su migración, proliferación y apoptosis, respectivamente (Aoki et al., 1999; George et al., 2001; Matsushita et al., 2000; Mayr et al., 2002; Yonemitsu et al., 1998). El análisis de ratones modificados genéticamente ha permitido establecer de modo concluyente una relación causa-efecto entre deficiencia de p53 y aceleramiento de la lesión vascular obstructiva en modelos de aterosclerosis, daño vascular mecánico y trasplante (Guevara et al., 1999; Mayr et al., 2002; Mercer et al., 2005; Merched et al., 2003; Sata et al., 2003; van Vlijmen et al., 2001). Sin embargo se desconoce si la ganancia de función de p53 puede limitar el desarrollo del ateroma. Para responder a esta pregunta, analizamos ratones apoE-KO (con dosis génica de p53 normal) y Súper p53-apoE-KO (portadores de un alelo adicional p53 que reproduce la expresión y regulación normal del gen p53 endógeno). Comprobamos la funcionalidad del transgen p53, ya que timocitos aislados de ratones irradiados presentaron mayor subpoblación G0/G1 (**figura 1A, trabajo 4, pág. 93**), de acuerdo con resultados previos con ratones Súper p53 (García-Cao et al., 2002).

El grado de hipercolesterolemia alcanzado al finalizar las 5 semanas de dieta aterogénica no mostró diferencias entre ambos grupos de ratones (**figura 1B, trabajo 4, pág. 93**). Tampoco vimos diferencias en el peso corporal de los ratones a lo largo de la dieta comparando genotipos (**figura 1C, trabajo 4, pág. 93**).

Sorprendentemente, la ganancia de función de p53 no afecta al tamaño del ateroma, formado espontáneamente o inducido por dieta hipercolesterolemia, tanto en mediciones *en face* con Oil Red O, o en cortes transversales de la aorta ascendente teñidos con hematoxilina-eosina (**figuras 2A, 2B y 2C, trabajo 4, pág. 94**). Únicamente mostró una modesta reducción en la región aórtica de máximo daño (zona I de la aorta ascendente analizada). El análisis de la composición de la lesión tras 7 semanas de dieta aterogénica muestra idénticos valores para celularidad, apoptosis y proliferación celular (**figura 4A, 4B, 4C, trabajo 4, pág. 96**). Tampoco vimos diferencias significativas en el contenido de macrófagos en la lesión (**figura 4D, trabajo 4, pág. 96**).

Quisimos estudiar si la ganancia de función de p53 podía tener un efecto en el desarrollo de la neointima producido por daño mecánico en la arteria femoral, a pesar de no haber sido eficaz en la reducción de aterosclerosis aórtica. Los resultados muestran que tanto el porcentaje de oclusión luminal como la relación Íntima/Media disminuyen en los ratones Súper p53-apoE-KO comparado con controles apoE-KO (**figura 3, trabajo 4, pág. 95**). Estos resultados están de acuerdo con estudios previos en los que se ha demostrado que la ganancia de función p53 mediante vectores adenovirales atenúan el desarrollo de la neointima

en modelos de denudación arterial (Matsushita et al., 2000; Scheinman et al., 1999b; Yonemitsu et al., 1998)

En el modelo de daño vascular utilizado, la apoptosis incrementa rápidamente durante las primeras 24 horas post-cirugía, disminuyendo hasta el nivel basal de un modo gradual y la proliferación celular tiene un pico a las dos semanas, disminuyendo a las cuatro semanas de la lesión (Reis et al., 2000). Nuestros resultados muestran una tasa de apoptosis y proliferación indistinguible entre genotipos a las 4 semanas de la operación, tanto en la media como en la íntima (**figura 5A y 5B, trabajo 4, pág. 97**). Si bien hubiese sido más adecuado analizar la apoptosis durante las primeras horas, nuestro interés principal era analizar el efecto sobre el desarrollo de la lesión.

Trabajos previos han demostrado que tanto la ausencia de p53 en los progenitores de médula ósea (Merched et al., 2003; van Vlijmen et al., 2001) como la sobreexpresión de p53 en CMLVs de una lesión preexistente (Chen et al., 2004; von der Thüsen et al., 2002) reducen el contenido de colágeno de la lesión relacionado con una mayor inestabilidad de la lesión. Nuestros resultados, tanto en el estudio de aterosclerosis como de daño mecánico, muestran un contenido de fibras de colágeno estadísticamente indistinguible entre genotipos. Sin embargo, en ambas condiciones patológicas observamos una tendencia a niveles reducidos de colágeno en los ratones portadores de un alelo extra de p53, sugiriendo la presencia de lesiones más vulnerables en estos ratones (27% en aterosclerosis inducida por dieta, y 42% en las arterias femorales lesionadas mecánicamente) (**figura 67, trabajo 4, pág. 98**).

**En resumen, nuestros resultados demuestran un efecto diferencial de p53 en modelos de daño vascular mecánico y aterosclerosis, siendo necesario profundizar en el papel de p53 en el desarrollo de la hiperplasia neointimal de cara a posibles terapias frente a estas patologías. De momento, los resultados obtenidos con un alelo extra de p53 muestran la eficacia de este gen supresor de tumores en la inhibición de la hiperplasia por daño mecánico, pero no en aterosclerosis, ni espontánea ni inducida por una dieta rica en grasa y colesterol.** Creemos que sería interesante analizar el efecto de duplicar la dotación génica de p53, pues podemos hipotetizar que un alelo extra no sea suficiente para reducir el desarrollo de la aterosclerosis.

Teniendo en cuenta que p21<sup>Cip1/WAF1</sup> es una diana transcripcional de p53, creemos oportuno discutir brevemente el papel de esta CKI sobre el desarrollo de lesiones vasculares obstructivas. Por una parte, se ha demostrado en diversos modelos de angioplastia, que la sobreexpresión

arterial de p21<sup>Cip1/WAF1</sup> silvestre o de un mutante con mayor estabilidad, reduce la proliferación de las CMLVs y la deposición de macrófagos, aumenta la apoptosis e inhibe el engrosamiento de la lesión neointima (Chang et al., 1995; Condorelli et al., 2001; Ueno et al., 1997; Yang et al., 1996). Sin embargo, Merched et al. observaron menos arteriosclerosis en ratones apoE-KO con disrupción de p21<sup>Cip1/WAF1</sup> global o selectiva en derivados de células hematopoyéticas comparado con controles con p21<sup>Cip1/WAF1</sup> intacto (Merched and Chan, 2004). Estos autores asociaron el efecto antiaterogénico de la disrupción de p21<sup>Cip1/WAF1</sup> con diversos efectos sobre macrófagos, tales como mayor actividad fagocítica, expresión aumentada de factores ateroprotectores (por ejemplo, proteína relacionada con RLDL, “scavenger receptor A”, SR-BI) y menor expresión de moléculas aterogénicas (por ejemplo, interleuquina-1 $\alpha$ , y proteínas inflamatorias de macrófago 1 y 2). Por otra parte, la inhibición de arteriosclerosis en ratones dobles deficientes en apoE- p21<sup>Cip1/WAF1</sup> se correlacionó con niveles mayores del ARN de los supresores de crecimiento p16, pRb y p53 en macrófagos.

Existen otros estudios que han demostrado efectos diferenciales de una misma proteína sobre el desarrollo de la neointima según se trate de aterosclerosis o daño mecánico. Así, p27<sup>Kip1</sup> reduce el desarrollo de la placa de atheroma (Díez-Juan and Andrés, 2001; Díez-Juan et al., 2004), pero el efecto de su inactivación sobre el engrosamiento de la neointima inducido por denudación mecánica es controvertido, con un trabajo en el que no se observaron diferencias respecto a controles con p27<sup>Kip1</sup> intacto (Roqué et al., 2001) y otro en el que se mostró un aumento significativo en ausencia de p27<sup>Kip1</sup> (Boehm et al., 2004). De un modo similar, la deficiencia en ICAM-1 protege a los ratones de desarrollar aterosclerosis tanto espontánea (Collins et al., 2000) como por trasplante (Zou et al., 2000), mientras que no tiene efecto protector frente a daño mecánico (Manka et al., 2001). Del mismo modo, ratones deficientes en RLDL presentan la misma lesión ateromatosa que los ratones silvestres –ambos deficientes en RLDL– aunque sufren un aumento en la neointima tras daño vascular (Tacke et al., 2002). Colectivamente, estos estudios sugieren diferencias importantes en el desarrollo de la lesión vascular obstructiva en el contexto de arteriosclerosis inducida por dislipemia, arteriosclerosis de trasplante y daño vascular mecánico.



## **CAPÍTULO 5**

### **CONCLUSIONES**





**1. El fármaco PCA-4230 inhibe la activación transcripcional del gen de ciclina A y la proliferación celular debido al bloqueo de la ruta ciclina D1/E2F**

- 1.1 PCA-4230 inhibe de un modo dependiente de dosis la proliferación de CMLVs primarias aisladas de arterias humanas y de embrión de rata, y de células tumorales, tanto aisladas de cánceres humanos como de embriones de ratón transformados con el oncogen c-Myc.
- 1.2 Este efecto citostático se correlaciona con una disminución en los niveles de las proteínas ciclina D1 y ciclina A, e inhibición de la actividad quinasa de la CDK2.
- 1.3 PCA-4230 inhibe de un modo dependiente de dosis la actividad del promotor de la ciclina A, y tanto la sobreexpresión de ciclina D1 como E2F reestablecen la transcripción de ciclina A en presencia de dosis inhibitoras del fármaco.
- 1.4 La sobreexpresión de E2F reestablece la actividad proliferativa de CMLVs de embrión de rata tratadas con dosis inhibitoras de PCA-4230.

**2. El inhibidor de tirosín quinasas STI571 bloquea en CMLVs la proliferación celular y la transcripción del gen de ciclina A por un mecanismo dependiente de la inactivación del factor de transcripción E2F y de las MAPKs, ERK1 y ERK2**

- 2.1 En CMLVs estimuladas con PDGF-BB, STI571 inhibe la fosforilación del receptor de este mitógeno y bloquea la proliferación celular.
- 2.2 En estos mismos cultivos, STI571 inhibe la activación de ERK1/2 y previene la acumulación temporal de las proteínas ciclina D1 y ciclina A que normalmente provoca la estimulación con PDGF-BB.
- 2.3 En experimentos de transfección transitoria, STI571 inhibe la expresión de genes reporteros cuya activación transcripcional dependen de las regiones -924/+245 y -79/+100 del promotor del gen de la ciclina A humana.
- 2.4 STI571 inhibe la actividad de unión a ADN de E2F en ensayos de retardo de movilidad electroforética, y el elemento *cis* de unión de este factor presente en el promotor de ciclina A es esencial para que el STI571 inhiba su activación transcripcional.
- 2.5 La activación constitutiva de ERK1/2 en células de músculo liso de arteria femoral de conejo previene o atenúa el efecto

citostático de STI571 y su capacidad de inhibir la transcripción del promotor de ciclina A.

**3. En ratones deficientes en apolipoproteína E alimentados con dieta rica en grasa y colesterol durante 1 mes el bloqueo de la fosforilación de p27<sup>Kip1</sup> en la treonina 187:**

- 3.1 No altera el grado de hipercolesterolemia alcanzado.
- 3.2 No aumenta los niveles de proteína p27<sup>Kip1</sup> en tejido aórtico.
- 3.3 No disminuye el tamaño del ateroma, ni afecta su celularidad y tasas de apoptosis y proliferación celular.

**4. La ganancia de función de p53 en ratones deficientes en apolipoproteína E reduce la hiperplasia de la neoíntima tras denudación mecánica, pero no afecta al desarrollo de la placa de ateroma, sugiriendo diferencias importantes en el papel que juega p53 en ambas situaciones patológicas**

- 4.1 Comparado con controles apoE-KO, la irradiación con <sup>137</sup>Cs provoca en ratones Súper p53-apoE-KO un mayor porcentaje de apoptosis en timocitos, demostrando que el alelo p53 extra es funcional.
- 4.2 El tamaño, celularidad, y tasas de apoptosis y proliferación celular del ateroma no difiere al comparar ratones Súper p53-apoE-KO y apoE-KO alimentados durante 7 semanas con dieta rica en grasa y colesterol.
- 4.3 La aterosclerosis espontánea tampoco se ve afectada por la presencia de un alelo extra de p53.
- 4.5 Sin embargo, la ganancia génica de p53 inhibe el desarrollo de la neoíntima en arteria femoral sometida a lesión mecánica. Este efecto inhibitorio no se acompaña de alteraciones en apoptosis ni proliferación ni en la lesión neoíntima ni en la túnica media.

## **CAPÍTULO 6**

## **BIBLIOGRAFÍA**



- American Heart Association, (1996). "Heart and Stroke Facts: 1996 Statistical Supplement".
- Abid, M. R., Yano, K., Guo, S., Patel, V. I., Shrikhande, G., Spokes, K. C., Ferran, C., and Aird, W. C. (2005). Forkhead transcription factors inhibit vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia. *J Biol Chem* 280, 29864-29873.
- Agarwal, M. L., Agarwal, A., Taylor, W. R., and Stark, G. R. (1995). p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 8493-8497.
- Aloni-Grinstein, R., Schwartz, D., and Rotter, V. (1995). Accumulation of wild-type p53 protein upon gamma-irradiation induces a G2 arrest-dependent immunoglobulin kappa light chain gene expression. *Embo J* 14, 1392-1401.
- Andrés, V., Ureña, J., Poch, E., Chen, D., and Goukassian, D. (2001). Role of Sp1 in the induction of p27 gene expression in vascular smooth muscle cells in vitro and after balloon angioplasty. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21, 342-347.
- Aoki, M., Morishita, R., Matsushita, H., Hayashi, S., Nakagami, H., Yamamoto, K., Moriguchi, A., Kaneda, Y., Higaki, J., and Ogihara, T. (1999). Inhibition of the p53 tumor suppressor gene results in growth of human aortic vascular smooth muscle cells. Potential role of p53 in regulation of vascular smooth muscle cell growth. *Hypertension* 34, 192-200.
- Atadja, P., Wong, H., Garkavtsev, I., Veillette, C., and Riabowol, K. (1995). Increased activity of p53 in senescing fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 8348-8352.
- Barlat, I., Henglein, B., Plet, A., Lamb, N., Fernandez, A., McKenzie, F., Pouyssegur, J., Vie, A., and Blanchard, J. M. (1995). TGF-beta 1 and cAMP attenuate cyclin A gene transcription via a cAMP responsive element through independent pathways. *Oncogene* 11, 1309-1318.
- Besson, A., Gurian-West, M., Chen, X., Kelly-Spratt, K. S., Kemp, C. J., and Roberts, J. M. (2006). A pathway in quiescent cells that controls p27Kip1 stability, subcellular localization, and tumor suppression. *Genes Dev* 20, 47-64.
- Bilder, G. E., Krawiec, J. A., McVety, K., Gazit, A., Gilon, C., Lyall, R., Zilberstein, A., Levitzki, A., Perrone, M. H., and Schreiber, A. B. (1991). Tyrphostins inhibit PDGF-induced DNA synthesis and associated early events in smooth muscle cells. *Am J Physiol* 260, C721-730.

- Boehm, M., Olive, M., True, A. L., Crook, M. F., San, H., Qu, X., and Nabel, E. G. (2004). Bone marrow-derived immune cells regulate vascular disease through a p27(Kip1)-dependent mechanism. *J Clin Invest* 114, 419-426.
- Boehm, M., Yoshimoto, T., Crook, M. F., Nallamshetty, S., True, A., Nabel, G. J., and Nabel, E. G. (2002). A growth factor-dependent nuclear kinase phosphorylates p27(Kip1) and regulates cell cycle progression. *Embo J* 21, 3390-3401.
- Bornfeldt, K. E., Raines, E. W., Nakano, T., Graves, L. M., Krebs, E. G., and Ross, R. (1994). Insulin-like growth factor-I and platelet-derived growth factor-BB induce directed migration of human arterial smooth muscle cells via signaling pathways that are distinct from those of proliferation. *J Clin Invest* 93, 1266-1274.
- Boucher, P., Gotthardt, M., Li, W. P., Anderson, R. G., and Herz, J. (2003). LRP: role in vascular wall integrity and protection from atherosclerosis. *Science* 300, 329-332.
- Braun-Dullaues, R. C., Mann, M. J., Ziegler, A., von der Leyen, H. E., and Dzau, V. J. (1999). A novel role for the cyclin-dependent kinase inhibitor p27<sup>Kip1</sup> in angiotensin II-stimulated vascular smooth muscle cell hypertrophy. *J Clin Invest* 104, 815-823.
- Buchdunger, E., Zimmermann, J., Mett, H., Meyer, T., Müller, M., Regenass, U., and Lydon, N. B. (1995). Selective inhibition of the platelet-derived growth factor signal transduction pathway by a protein-tyrosine kinase inhibitor of the 2-phenylaminopyrimidine class. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 2558-2562.
- Burrig, K. F. (1991). The endothelium of advanced arteriosclerotic plaques in humans. *Arterioscler Thromb* 11, 1678-1689.
- Campbell, G. R., and Campbell, J. H. (1990). The phenotypes of smooth muscle expressed in human atheroma. *Ann N Y Acad Sci* 598, 143-158.
- Carrano, A. C., Eytan, E., Hershko, A., and Pagano, M. (1999). SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. *Nat Cell Biol* 1, 193-199.
- Castro, C., Díez-Juan, A., Cortés, M. J., and Andrés, V. (2003). Distinct regulation of mitogen-activated protein kinases and p27<sup>Kip1</sup> in smooth muscle cells from different vascular beds. A potential role in establishing regional phenotypic variance. *J Biol Chem* 278, 4482-4490.
- Chamley-Campbell, J. H., Campbell, G. R., and Ross, R. (1981). Phenotype-dependent response of cultured aortic smooth muscle to serum mitogens. *J Cell Biol* 89, 379-383.
- Chang, M. W., Barr, E., Lu, M. M., Barton, K., and Leiden, J. M. (1995). Adenovirus-mediated over-expression of the cyclin/cyclin-

- dependent kinase inhibitor, p21 inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation in the rat carotid artery model of balloon angioplasty. *J Clin Invest* 96, 2260-2268.
- Chen, D., Krasinski, K., Sylvester, A., Chen, J., Nisen, P. D., and Andrés, V. (1997). Downregulation of cyclin-dependent kinase 2 activity and cyclin A promoter activity in vascular smooth muscle cells by p27(KIP1), an inhibitor of neointima formation in the rat carotid artery. *J Clin Invest* 99, 2334-2341.
- Chen, W. Q., Zhang, Y., Zhang, M., Ji, X. P., Yin, Y., and Zhu, Y. F. (2004). Establishing an animal model of unstable atherosclerotic plaques. *Chin Med J (Engl)* 117, 1293-1298.
- Cillero, F. J., Navarro, J. L., Narvaiza, J. T., Priego, J. G., and Ortega, M. P. (1991). Clinical Pharmacology (Phase I) of PCA-4230, a new antithrombotic agent, in healthy volunteers. *Thromb Haemost* 65, 1145.
- Collins, R. G., Velji, R., Guevara, N. V., Hicks, M. J., Chan, L., and Beaudet, A. L. (2000). P-Selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Exp Med* 191, 189-194.
- Condorelli, G., Aycock, J. K., Frati, G., and Napoli, C. (2001). Mutated p21/WAF/CIP transgene overexpression reduces smooth muscle cell proliferation, macrophage deposition, oxidation-sensitive mechanisms, and restenosis in hypercholesterolemic apolipoprotein E knockout mice. *Faseb J* 15, 2162-2170.
- Connor, M. K., Kotchetkov, R., Cariou, S., Resch, A., Lupetti, R., Beniston, R. G., Melchior, F., Hengst, L., and Slingerland, J. M. (2003). CRM1/Ran-mediated nuclear export of p27(Kip1) involves a nuclear export signal and links p27 export and proteolysis. *Mol Biol Cell* 14, 201-213.
- Cortés, M. J., Díez-Juan, A., Pérez, P., Pérez-Roger, I., Arroyo-Pellicer, R., and Andrés, V. (2002). Increased early atherogenesis in young versus old hypercholesterolemic rabbits by a mechanism independent of arterial cell proliferation. *FEBS Lett* 522, 99-103.
- Dameron, K. M., Volpert, O. V., Tainsky, M. A., and Bouck, N. (1994). Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science* 265, 1582-1584.
- Dartsch, P. C., Voisard, R., Bauriedel, G., Hofling, B., and Betz, E. (1990). Growth characteristics and cytoskeletal organization of cultured smooth muscle cells from human primary stenosing and restenosing lesions. *Arteriosclerosis* 10, 62-75.
- Davis, R. J. (1993). The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem* 268, 14553-14556.

- del Río, M., Sunkel, C., Larcher, F., and Ortega, M. P. (1997). Antiproliferative effects of PCA-4230, a new antithrombotic drug, in vascular smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 120, 1360-1366.
- Deng, C., Zhang, P., Harper, J. W., Elledge, S. J., and Leder, P. (1995). Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell* 82, 675-684.
- Deng, X., Mercer, S. E., Shah, S., Ewton, D. Z., and Friedman, E. (2004). The cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is stabilized in G(0) by Mirk/dyrk1B kinase. *J Biol Chem* 279, 22498-22504.
- Desdouets, C., Matesic, G., Molina, C. A., Foulkes, N. S., Sassone-Corsi, P., Brechot, C., and Sobczak-Thepot, J. (1995). Cell cycle regulation of cyclin A gene expression by the cyclic AMP-responsive transcription factors CREB and CREM. *Mol Cell Biol* 15, 3301-3309.
- Díez-Juan, A., and Andrés, V. (2001). The growth suppressor p27(Kip1) protects against diet-induced atherosclerosis. *Faseb J* 15, 1989-1995.
- Díez-Juan, A., and Andrés, V. (2003). Coordinate control of proliferation and migration by the p27Kip1/cyclin-dependent kinase/retinoblastoma pathway in vascular smooth muscle cells and fibroblasts. *Circ Res* 92, 402-410.
- Díez-Juan, A., Pérez, P., Aracil, M., Sancho, D., Bernad, A., Sánchez-Madrid, F., and Andrés, V. (2004). Selective inactivation of p27(Kip1) in hematopoietic progenitor cells increases neointimal macrophage proliferation and accelerates atherosclerosis. *Blood* 103, 158-161.
- Driscoll, D. M., and Getz, G. S. (1984). Extrahepatic synthesis of apolipoprotein E. *J Lipid Res* 25, 1368-1379.
- Druker, B. J. (2002). Imatinib and chronic myeloid leukemia: validating the promise of molecularly targeted therapy. *Eur J Cancer* 38 Suppl 5, S70-76.
- Dudley, A., Gilbert, R. E., Thomas, D., Cox, A., Price, J. T., Best, J., and Jenkins, A. (2003). STI-571 inhibits in vitro angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 310, 135-142.
- Dyson, N. (1998). The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev* 12, 2245-2262.
- Elledge, S. J. (1996). Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* 274, 1664-1672.
- Escobedo, J. A., Navankasatussas, S., Cousens, L. S., Coughlin, S. R., Bell, G. I., and Williams, L. T. (1988). A common PDGF receptor



- is activated by homodimeric A and B forms of PDGF. *Science* 240, 1532-1534.
- Eskes, R., Antonsson, B., Osen-Sand, A., Montessuit, S., Richter, C., Sadoul, R., Mazzei, G., Nichols, A., and Martinou, J. C. (1998). Bax-induced cytochrome C release from mitochondria is independent of the permeability transition pore but highly dependent on Mg<sup>2+</sup> ions. *J Cell Biol* 143, 217-224.
- Essed, C. E., Van den Brand, M., and Becker, A. E. (1983). Transluminal coronary angioplasty and early restenosis. Fibrocellular occlusion after wall laceration. *Br Heart J* 49, 393-396.
- Evans, T., Rosenthal, E. T., Youngblom, J., Distel, D., and Hunt, T. (1983). Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* 33, 389-396.
- Fero, M. L., Rivkin, M., Tasch, M., Porter, P., Carow, C. E., Firpo, E., Polyak, K., Tsai, L. H., Broudy, V., Perlmutter, R. M., *et al.* (1996). A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27(Kip1)-deficient mice. *Cell* 85, 733-744.
- Fuster, V., Badimon, L., Badimon, J. J., and Chesebro, J. H. (1992). The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1). *N Engl J Med* 326, 242-250.
- Ganoth, D., Bornstein, G., Ko, T. K., Larsen, B., Tyers, M., Pagano, M., and Hershko, A. (2001). The cell-cycle regulatory protein Cks1 is required for SCF(Skp2)-mediated ubiquitinylation of p27. *Nat Cell Biol* 3, 321-324.
- García Almagro, F. J., Pinar Bermúdez, E., López-Palop, R., and Valdés Chávarri, M. (2001). Arteriosclerosis. *Medicine* 8, 2267-2273.
- García-Cao, I., García-Cao, M., Martín-Caballero, J., Criado, L. M., Klatt, P., Flores, J. M., Weill, J. C., Blasco, M. A., and Serrano, M. (2002). "Super p53" mice exhibit enhanced DNA damage response, are tumor resistant and age normally. *Embo J* 21, 6225-6235.
- Geary, R. L., Williams, J. K., Golden, D., Brown, D. G., Benjamin, M. E., and Adams, M. R. (1996). Time course of cellular proliferation, intimal hyperplasia, and remodeling following angioplasty in monkeys with established atherosclerosis. A nonhuman primate model of restenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16, 34-43.
- George, S. J., Angelini, G. D., Capogrossi, M. C., and Baker, A. H. (2001). Wild-type p53 gene transfer inhibits neointima formation

- in human saphenous vein by modulation of smooth muscle cell migration and induction of apoptosis. *Gene Ther* 8, 668-676.
- Girard, F., Strausfeld, U., Fernandez, A., and Lamb, N. J. (1991). Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts. *Cell* 67, 1169-1179.
- Goping, I. S., Gross, A., Lavoie, J. N., Nguyen, M., Jemmerson, R., Roth, K., Korsmeyer, S. J., and Shore, G. C. (1998). Regulated targeting of BAX to mitochondria. *J Cell Biol* 143, 207-215.
- Gordon, D., Reidy, M. A., Benditt, E. P., and Schwartz, S. M. (1990). Cell proliferation in human coronary arteries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 4600-4604.
- Gown, A. M., Tsukada, T., and Ross, R. (1986). Human atherosclerosis. II. Immunocytochemical analysis of the cellular composition of human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* 125, 191-207.
- Graña, X., and Reddy, E. P. (1995). Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). *Oncogene* 11, 211-219.
- Grotendorst, G. R., Chang, T., Seppa, H. E., Kleinman, H. K., and Martin, G. R. (1982). Platelet-derived growth factor is a chemoattractant for vascular smooth muscle cells. *J Cell Physiol* 113, 261-266.
- Groves, P. H., Banning, A. P., Penny, W. J., Lewis, M. J., Cheadle, H. A., and Newby, A. C. (1995). Kinetics of smooth muscle cell proliferation and intimal thickening in a pig carotid model of balloon injury. *Atherosclerosis* 117, 83-96.
- Gruentzig, A. R. (1984). Seven years of coronary angioplasty. *Z Kardiol* 73 Suppl 2, 159-160.
- Guevara, N. V., Kim, H. S., Antonova, E. I., and Chan, L. (1999). The absence of p53 accelerates atherosclerosis by increasing cell proliferation in vivo. *Nat Med* 5, 335-339.
- Gutiérrez Díaz, J. A., Tolon, R. M., Sunkel, C., Priego, J. G., and Ortega, M. P. (1992). Interaction of platelets with subendothelium in rats treated with PCA-4230, a new antithrombotic agent. Effect of PCA-4230 on experimental thrombosis. *Haemostasis* 22, 202-210.
- Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Hao, B., Zheng, N., Schulman, B. A., Wu, G., Miller, J. J., Pagano, M., and Pavletich, N. P. (2005). Structural basis of the Cks1-dependent recognition of p27(Kip1) by the SCF(Skp2) ubiquitin ligase. *Mol Cell* 20, 9-19.

- Hao, H., Gabbiani, G., and Bochaton-Piallat, M. L. (2003). Arterial smooth muscle cell heterogeneity: implications for atherosclerosis and restenosis development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 1510-1520.
- Harper, J. W., Elledge, S. J., Keyomarsi, K., Dynlacht, B., Tsai, L. H., Zhang, P., Dobrowolski, S., Bai, C., Connell-Crowley, L., Swindell, E., and et al. (1995). Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21. *Mol Biol Cell* 6, 387-400.
- Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A., and Oren, M. (1997). Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 387, 296-299.
- Heldin, C. H., Ernlund, A., Rorsman, C., and Ronnstrand, L. (1989). Dimerization of B-type platelet-derived growth factor receptors occurs after ligand binding and is closely associated with receptor kinase activation. *J Biol Chem* 264, 8905-8912.
- Hengst, L., and Reed, S. I. (1996). Translational control of p27Kip1 accumulation during the cell cycle. *Science* 271, 1861-1864.
- Hui, D. Y., Innerarity, T. L., and Mahley, R. W. (1981). Lipoprotein binding to canine hepatic membranes. Metabolically distinct apo-E and apo-B,E receptors. *J Biol Chem* 256, 5646-5655.
- Hultg rth-Nilsson, A., Krondahl, U., Querol-Ferrer, V., and Rigertz, N. R. (1991). Differences in growth factor response in smooth muscle cells isolated from adult and neonatal rats. *Differentiation* 47, 99-105.
- Hurteau, J. A., Brutkiewicz, S. A., Wang, Q., Allison, B. M., Goebel, M. G., and Harrington, M. A. (2002). Overexpression of a stabilized mutant form of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) inhibits cell growth. *Gynecol Oncol* 86, 19-23.
- Iacopetta, B., Wysocki, S., Norman, P., and House, A. (1995). The p53 tumor suppressor gene is overexpressed but not mutated in human atherosclerotic tissue. *Int J Oncol* 7, 399-402.
- Ihling, C., Haendeler, J., Menzel, G., Hess, R. D., Fraedrich, G., Schaefer, H. E., and Zeiher, A. M. (1998). Co-expression of p53 and MDM2 in human atherosclerosis: implications for the regulation of cellularity of atherosclerotic lesions. *J Pathol* 185, 303-312.
- Ihling, C., Menzel, G., Wellens, E., Monting, J. S., Schaefer, H. E., and Zeiher, A. M. (1997). Topographical association between the cyclin-dependent kinases inhibitor P21, p53 accumulation, and cellular proliferation in human atherosclerotic tissue. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17, 2218-2224.
- Ihling, C., Technau, K., Gross, V., Schulte-Monting, J., Zeiher, A. M., and Schaefer, H. E. (1999). Concordant upregulation of type II-TGF-beta-receptor, the cyclin- dependent kinases inhibitor p27<sup>Kip1</sup>

- and cyclin E in human atherosclerotic tissue: implications for lesion cellularity. *Atherosclerosis* 144, 7-14.
- Ishida, N., Hara, T., Kamura, T., Yoshida, M., Nakayama, K., and Nakayama, K. I. (2002). Phosphorylation of p27Kip1 on serine 10 is required for its binding to CRM1 and nuclear export. *J Biol Chem* 277, 14355-14358.
- Ishigami, M., Swertfeger, D. K., Granholm, N. A., and Hui, D. Y. (1998). Apolipoprotein E inhibits platelet-derived growth factor-induced vascular smooth muscle cell migration and proliferation by suppressing signal transduction and preventing cell entry to G1 phase. *J Biol Chem* 273, 20156-20161.
- Ito, A., Shimokawa, H., Kadokami, T., Fukumoto, Y., Owada, M. K., Shiraishi, T., Nakaike, R., Takayanagi, T., Egashira, K., and Takeshita, A. (1995). Tyrosine kinase inhibitor suppresses coronary arteriosclerotic changes and vasospastic responses induced by chronic treatment with interleukin-1 beta in pigs in vivo. *J Clin Invest* 96, 1288-1294.
- Jonasson, L., Holm, J., Skalli, O., Bondjers, G., and Hansson, G. K. (1986). Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis* 6, 131-138.
- Kamura, T., Hara, T., Matsumoto, M., Ishida, N., Okumura, F., Hatakeyama, S., Yoshida, M., Nakayama, K., and Nakayama, K. I. (2004). Cytoplasmic ubiquitin ligase KPC regulates proteolysis of p27(Kip1) at G1 phase. *Nat Cell Biol* 6, 1229-1235.
- Katayose, D., Wersto, R., Cowan, K., and Seth, P. (1995). Consequences of p53 gene expression by adenovirus vector on cell cycle arrest and apoptosis in human aortic vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 215, 446-451.
- Katsuda, S., Coltrera, M. D., Ross, R., and Gown, A. M. (1993). Human atherosclerosis. IV. Immunocytochemical analysis of cell activation and proliferation in lesions of young adults. *Am J Pathol* 142, 1787-1793.
- Kearney, M., Pieczek, A., Haley, L., Losordo, D. W., Andres, V., Schainfeld, R., Rosenfield, K., and Isner, J. M. (1997). Histopathology of in-stent restenosis in patients with peripheral artery disease. *Circulation* 95, 1998-2002.
- Kiyokawa, H., Kineman, R. D., Manova-Todorova, K. O., Soares, V. C., Hoffman, E. S., Ono, M., Khanam, D., Hayday, A. C., Frohman, L. A., and Koff, A. (1996). Enhanced growth of mice lacking the cyclin-dependent kinase inhibitor function of p27(Kip1). *Cell* 85, 721-732.

- Kohchi, K., Takebayashi, S., Block, P. C., Hiroki, T., and Nobuyoshi, M. (1987). Arterial changes after percutaneous transluminal coronary angioplasty: results at autopsy. *J Am Coll Cardiol* *10*, 592-599.
- Kossatz, U., Dietrich, N., Zender, L., Buer, J., Manns, M. P., and Malek, N. P. (2004). Skp2-dependent degradation of p27kip1 is essential for cell cycle progression. *Genes Dev* *18*, 2602-2607.
- Kotake, Y., Nakayama, K., Ishida, N., and Nakayama, K. I. (2005). Role of serine 10 phosphorylation in p27 stabilization revealed by analysis of p27 knock-in mice harboring a serine 10 mutation. *J Biol Chem* *280*, 1095-1102.
- Kubbutat, M. H., Jones, S. N., and Vousden, K. H. (1997). Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* *387*, 299-303.
- Li, S., Fan, Y. S., Chow, L. H., Van Den Diepstraten, C., van Der Veer, E., Sims, S. M., and Pickering, J. G. (2001). Innate diversity of adult human arterial smooth muscle cells: cloning of distinct subtypes from the internal thoracic artery. *Circ Res* *89*, 517-525.
- Liang, J., Zubovitz, J., Petrocelli, T., Kotchetkov, R., Connor, M. K., Han, K., Lee, J. H., Ciarallo, S., Catzavelos, C., Beniston, R., *et al.* (2002). PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest. *Nat Med* *8*, 1153-1160.
- Mabin, T. A., Holmes, D. R., Jr., Smith, H. C., Vlietstra, R. E., Reeder, G. S., Bresnahan, J. F., Bove, A. A., Hammes, L. N., Elveback, L. R., and Orszulak, T. A. (1985). Follow-up clinical results in patients undergoing percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Circulation* *71*, 754-760.
- Mahley, R. W. (1986). The molecular basis of atherosclerosis: concepts derived from studies of lipoprotein metabolism and cell biology. *Clin Invest Med* *9*, 304-308.
- Mahley, R. W., and Ji, Z. S. (1999). Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. *J Lipid Res* *40*, 1-16.
- Majack, R. A., Grieshaber, N. A., Cook, C. L., Weiser, M. C., McFall, R. C., Grieshaber, S. S., Reidy, M. A., and Reilly, C. F. (1996). Smooth muscle cells isolated from the neointima after vascular injury exhibit altered responses to platelet-derived growth factor and other stimuli. *J Cell Physiol* *167*, 106-112.
- Malek, N. P., Sundberg, H., McGrew, S., Nakayama, K., Kyriakides, T. R., Roberts, J. M., and Kyriakidis, T. R. (2001). A mouse knock-in model exposes sequential proteolytic pathways that regulate p27Kip1 in G1 and S phase. *Nature* *413*, 323-327.
- Malicet, C., Hoffmeister, A., Moreno, S., Closa, D., Dagorn, J. C., Vasseur, S., and Iovanna, J. L. (2006). Interaction of the stress

- protein p8 with Jab1 is required for Jab1-dependent p27 nuclear-to-cytoplasm translocation. *Biochem Biophys Res Commun* 339, 284-289.
- Manka, D., Collins, R. G., Ley, K., Beaudet, A. L., and Sarembock, I. J. (2001). Absence of p-selectin, but not intercellular adhesion molecule-1, attenuates neointimal growth after arterial injury in apolipoprotein e-deficient mice. *Circulation* 103, 1000-1005.
- Mann, J. M., and Davies, M. J. (1996). Vulnerable plaque. Relation of characteristics to degree of stenosis in human coronary arteries. *Circulation* 94, 928-931.
- Matsushita, H., Morishita, R., Aoki, M., Tomita, N., Taniyama, Y., Nakagami, H., Shimozato, T., Higaki, J., Kaneda, Y., and Ogihara, T. (2000). Transfection of antisense p53 tumor suppressor gene oligodeoxynucleotides into rat carotid artery results in abnormal growth of vascular smooth muscle cells. *Circulation* 101, 1447-1452.
- Mayr, U., Mayr, M., Li, C., Wernig, F., Dietrich, H., Hu, Y., and Xu, Q. (2002). Loss of p53 accelerates neointimal lesions of vein bypass grafts in mice. *Circ Res* 90, 197-204.
- McArthur, J. G., Qian, H., Citron, D., Banik, G. G., Lamphere, L., Gyuris, J., Tsui, L., and George, S. E. (2001). p27-p16 Chimera: a superior antiproliferative for the prevention of neointimal hyperplasia. *Mol Ther* 3, 8-13.
- McMillan, G. C., and Stary, H. C. (1968). Preliminary experience with mitotic activity of cellular elements in the atherosclerotic plaques of cholesterol-fed rabbits studied by labeling with tritiated thymidine. *Ann N Y Acad Sci* 149, 699-709.
- Mercer, J., Figg, N., Stoneman, V., Braganza, D., and Bennett, M. R. (2005). Endogenous p53 protects vascular smooth muscle cells from apoptosis and reduces atherosclerosis in ApoE knockout mice. *Circ Res* 96, 667-674.
- Merched, A. J., and Chan, L. (2004). Absence of p21Waf1/Cip1/Sdi1 modulates macrophage differentiation and inflammatory response and protects against atherosclerosis. *Circulation* 110, 3830-3841.
- Merched, A. J., Williams, E., and Chan, L. (2003). Macrophage-specific p53 expression plays a crucial role in atherosclerosis development and plaque remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 1608-1614.
- Michieli, P., Chedid, M., Lin, D., Pierce, J. H., Mercer, W. E., and Givol, D. (1994). Induction of WAF1/CIP1 by a p53-independent pathway. *Cancer Res* 54, 3391-3395.
- Millard, S. S., Yan, J. S., Nguyen, H., Pagano, M., Kiyokawa, H., and Koff, A. (1997). Enhanced ribosomal association of p27(Kip1)

- mRNA is a mechanism contributing to accumulation during growth arrest. *J Biol Chem* 272, 7093-7098.
- Miskimins, W. K., Wang, G., Hawkinson, M., and Miskimins, R. (2001). Control of cyclin-dependent kinase inhibitor p27 expression by cap-independent translation. *Mol Cell Biol* 21, 4960-4967.
- Miyashita, T., and Reed, J. C. (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80, 293-299.
- Miyata, M., and Smith, J. D. (1996). Apolipoprotein E allele-specific antioxidant activity and effects on cytotoxicity by oxidative insults and beta-amyloid peptides. *Nat Genet* 14, 55-61.
- Montagnoli, A., Fiore, F., Eytan, E., Carrano, A. C., Draetta, G. F., Herskho, A., and Pagano, M. (1999). Ubiquitination of p27 is regulated by Cdk-dependent phosphorylation and trimeric complex formation. *Genes Dev* 13, 1181-1189.
- Morisaki, H., Fujimoto, A., Ando, A., Nagata, Y., Ikeda, K., and Nakanishi, M. (1997). Cell cycle-dependent phosphorylation of p27 cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitor by cyclin E/Cdk2. *Biochem Biophys Res Commun* 240, 386-390.
- Motwani, J. G., and Topol, E. J. (1998). Aortocoronary saphenous vein graft disease: pathogenesis, predisposition, and prevention. *Circulation* 97, 916-931.
- Muñoz-Fontela, C., Angel García, M., García-Cao, I., Collado, M., Arroyo, J., Esteban, M., Serrano, M., and Rivas, C. (2005). Resistance to viral infection of super p53 mice. *Oncogene*.
- Murray, C. J. L., and Lopez, A. D. (1996). The global burden of disease: a comprehensive assessment of mortality and disability from diseases, injury, and risk factors in 1990 and projected to 2020. Cambridge, Mass: Harvard University Press.
- Myllärniemi, M., Calderón, L., Lemström, K., Buchdunger, E., and Häyry, P. (1997). Inhibition of platelet-derived growth factor receptor tyrosine kinase inhibits vascular smooth muscle cell migration and proliferation. *Faseb J* 11, 1119-1126.
- Myllärniemi, M., Frosen, J., Calderón Ramírez, L. G., Buchdunger, E., Lemstrom, K., and Häyry, P. (1999). Selective tyrosine kinase inhibitor for the platelet-derived growth factor receptor in vitro inhibits smooth muscle cell proliferation after reinjury of arterial intima in vivo. *Cardiovasc Drugs Ther* 13, 159-168.
- Nakashima, Y., Plump, A. S., Raines, E. W., Breslow, J. L., and Ross, R. (1994). ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb* 14, 133-140.

- Nakayama, K., Ishida, N., Shirane, M., Inomata, A., Inoue, T., Shishido, N., Horii, I., and Loh, D. Y. (1996). Mice lacking p27(Kip1) display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors. *Cell* 85, 707-720.
- Nakayama, K., Nagahama, H., Minamishima, Y. A., Matsumoto, M., Nakamichi, I., Kitagawa, K., Shirane, M., Tsunematsu, R., Tsukiyama, T., Ishida, N., *et al.* (2000). Targeted disruption of Skp2 results in accumulation of cyclin E and p27(Kip1), polyploidy and centrosome overduplication. *Embo J* 19, 2069-2081.
- Nakayama, K., Nagahama, H., Minamishima, Y. A., Miyake, S., Ishida, N., Hatakeyama, S., Kitagawa, M., Iemura, S., Natsume, T., and Nakayama, K. I. (2004). Skp2-mediated degradation of p27 regulates progression into mitosis. *Dev Cell* 6, 661-672.
- Nakayama, K. I., Hatakeyama, S., and Nakayama, K. (2001). Regulation of the cell cycle at the G1-S transition by proteolysis of cyclin E and p27Kip1. *Biochem Biophys Res Commun* 282, 853-860.
- Nishina, P. M., Verstuyft, J., and Paigen, B. (1990). Synthetic low and high fat diets for the study of atherosclerosis in the mouse. *J Lipid Res* 31, 859-869.
- Nobuyoshi, M., Kimura, T., Ohishi, H., Horiuchi, H., Nosaka, H., Hamasaki, N., Yokoi, H., and Kim, K. (1991). Restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty: pathologic observations in 20 patients. *J Am Coll Cardiol* 17, 433-439.
- O'Brien, E. R., Alpers, C. E., Stewart, D. K., Ferguson, M., Tran, N., Gordon, D., Benditt, E. P., Hinohara, T., Simpson, J. B., and Schwartz, S. M. (1993). Proliferation in primary and restenotic coronary atherectomy tissue. Implications for antiproliferative therapy. *Circ Res* 73, 223-231.
- O'Connor, P. M. (1997). Mammalian G1 and G2 phase checkpoints. *Cancer Surv* 29, 151-182.
- Olson, N. E., Kozlowski, J., and Reidy, M. A. (2000). Proliferation of intimal smooth muscle cells. Attenuation of basic fibroblast growth factor 2-stimulated proliferation is associated with increased expression of cell cycle inhibitors. *J Biol Chem* 275, 11270-11277.
- Orehov, A. N., Andreeva, E. R., Mikhailova, I. A., and Gordon, D. (1998). Cell proliferation in normal and atherosclerotic human aorta: proliferative splash in lipid-rich lesions. *Atherosclerosis* 139, 41-48.
- Ortega, M. P., Sunkel, C., Gómez, M. M., Santos, L., Fau de la Casa-Juana, M., and Prieto, J. (1993). A new generation of 1,4-



- dihidropyridines showing novel pharmacological properties. *Curr Topics Med Chem* 1, 83-91.
- Owen-Schaub, L. B., Zhang, W., Cusack, J. C., Angelo, L. S., Santee, S. M., Fujiwara, T., Roth, J. A., Deisseroth, A. B., Zhang, W. W., Kruzel, E., and et al. (1995). Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression. *Mol Cell Biol* 15, 3032-3040.
- Pagano, M., Pepperkok, R., Verde, F., Ansorge, W., and Draetta, G. (1992). Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *Embo J* 11, 961-971.
- Pagano, M., Tam, S. W., Theodoras, A. M., Beer-Romero, P., Del Sal, G., Chau, V., Yew, P. R., Draetta, G. F., and Rolfe, M. (1995). Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science* 269, 682-685.
- Park, K. H., Seol, J. Y., Kim, T. Y., Yoo, C. G., Kim, Y. W., Han, S. K., Shim, Y. S., and Lee, C. T. (2001). An adenovirus expressing mutant p27 showed more potent antitumor effects than adenovirus-p27 wild type. *Cancer Res* 61, 6163-6169.
- Phillips-Hughes, J., and Kandarpa, K. (1996). Restenosis: pathophysiology and preventive strategies. *J Vasc Interv Radiol* 7, 321-333.
- Pickering, J. G., Weir, L., Jekanowski, J., Kearney, M. A., and Isner, J. M. (1993). Proliferative activity in peripheral and coronary atherosclerotic plaque among patients undergoing percutaneous revascularization. *J Clin Invest* 91, 1469-1480.
- Piedrahita, J. A., Zhang, S. H., Hagan, J. R., Oliver, P. M., and Maeda, N. (1992). Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 4471-4475.
- Pines, J. (1995). Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view. *Biochem J* 308 ( Pt 3), 697-711.
- Plump, A. S., Smith, J. D., Hayek, T., Aalto-Setälä, K., Walsh, A., Verstuyft, J. G., Rubin, E. M., and Breslow, J. L. (1992). Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell* 71, 343-353.
- Reddick, R. L., Zhang, S. H., and Maeda, N. (1994). Atherosclerosis in mice lacking apo E. Evaluation of lesional development and progression. *Arterioscler Thromb* 14, 141-147.
- Reis, E. D., Roqué, M., Cordon-Cardo, C., Drobnyak, M., Fuster, V., and Badimon, J. J. (2000). Apoptosis, proliferation, and p27 expression during vessel wall healing: time course study in a

- mouse model of transluminal femoral artery injury. *J Vasc Surg* 32, 1022-1029.
- Rekhter, M. D., and Gordon, D. (1995). Active proliferation of different cell types, including lymphocytes, in human atherosclerotic plaques. *Am J Pathol* 147, 668-677.
- Resnitzky, D., Hengst, L., and Reed, S. I. (1995). Cyclin A-associated kinase activity is rate limiting for entrance into S phase and is negatively regulated in G1 by p27Kip1. *Mol Cell Biol* 15, 4347-4352.
- Riddell, D. R., Graham, A., and Owen, J. S. (1997). Apolipoprotein E inhibits platelet aggregation through the L-arginine:nitric oxide pathway. Implications for vascular disease. *J Biol Chem* 272, 89-95.
- Rodríguez-Campos, A., Ruiz-Enríquez, P., Faraudo, S., and Badimon, L. (2001). Mitogen-induced p53 downregulation precedes vascular smooth muscle cell migration from healthy tunica media and proliferation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21, 214-219.
- Roqué, M., Cerdón-Cardo, C., Fuster, V., Reis, E. D., Drobnjak, M., and Badimon, J. J. (2000). Modulation of apoptosis, proliferation, and p27 expression in a porcine coronary angioplasty model. *Atherosclerosis* 153, 315-322.
- Roqué, M., Reis, E. D., Cerdón-Cardo, C., Taubman, M. B., Fallon, J. T., Fuster, V., and Badimon, J. J. (2001). Effect of p27 deficiency and rapamycin on intimal hyperplasia: in vivo and in vitro studies using a p27 knockout mouse model. *Lab Invest* 81, 895-903.
- Rosenberg, A. R., Zindy, F., Le Deist, F., Mouly, H., Metzeau, P., Brechot, C., and Lamas, E. (1995). Overexpression of human cyclin A advances entry into S phase. *Oncogene* 10, 1501-1509.
- Rosenfeld, M. E., Polinsky, P., Virmani, R., Kauser, K., Rubanyi, G., and Schwartz, S. M. (2000). Advanced atherosclerotic lesions in the innominate artery of the ApoE knockout mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20, 2587-2592.
- Rosenfeld, M. E., and Ross, R. (1990). Macrophage and smooth muscle cell proliferation in atherosclerotic lesions of WHHL and comparably hypercholesterolemic fat-fed rabbits. *Arteriosclerosis* 10, 680-687.
- Ross, J. S., Stagliano, N. E., Donovan, M. J., Breitbart, R. E., and Ginsburg, G. S. (2001). Atherosclerosis and cancer: common molecular pathways of disease development and progression. *Ann N Y Acad Sci* 947, 271-292; discussion 292-273.
- Ross, R. (1986). The pathogenesis of atherosclerosis--an update. *N Engl J Med* 314, 488-500.

- Ross, R. (1993). The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362, 801-809.
- Ross, R. (1999). Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340, 115-126.
- Ross, R., Raines, E. W., and Bowen-Pope, D. F. (1986). The biology of platelet-derived growth factor. *Cell* 46, 155-169.
- Roubin, G. S., Douglas, J. S., Jr., King, S. B., 3rd, Lin, S. F., Hutchison, N., Thomas, R. G., and Gruentzig, A. R. (1988). Influence of balloon size on initial success, acute complications, and restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. A prospective randomized study. *Circulation* 78, 557-565.
- Sa, G., and Stacey, D. W. (2004). P27 expression is regulated by separate signaling pathways, downstream of Ras, in each cell cycle phase. *Exp Cell Res* 300, 427-439.
- Santamaria, D., and Ortega, S. (2006). Cyclins and CDKS in development and cancer: lessons from genetically modified mice. *Front Biosci* 11, 1164-1188.
- Sata, M., Tanaka, K., Ishizaka, N., Hirata, Y., and Nagai, R. (2003). Absence of p53 leads to accelerated neointimal hyperplasia after vascular injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 1548-1552.
- Scheinman, M., Ascher, E., Kallakuri, S., Hingorani, A., Gade, P., Sherman, M., Seth, P., and Jacob, T. (1999a). P53 gene transfer to the injured rat carotid artery promotes apoptosis. *Surgery* 126, 863-868.
- Scheinman, M., Ascher, E., Levi, G. S., Hingorani, A., Shirazian, D., and Seth, P. (1999b). p53 gene transfer to the injured rat carotid artery decreases neointimal formation. *J Vasc Surg* 29, 360-369.
- Schulze, A., Zerfass, K., Spitkovsky, D., Middendorp, S., Berges, J., Helin, K., Jansen-Dürr, P., and Henglein, B. (1995). Cell cycle regulation of the cyclin A gene promoter is mediated by a variant E2F site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 11264-11268.
- Schwartz, S. M., Heimark, R. L., and Majesky, M. W. (1990). Developmental mechanisms underlying pathology of arteries. *Physiol Rev* 70, 1177-1209.
- Scott, S., O'Sullivan, M., Hafizi, S., Shapiro, L. M., and Bennett, M. R. (2002). Human vascular smooth muscle cells from restenosis or in-stent stenosis sites demonstrate enhanced responses to p53: implications for brachytherapy and drug treatment for restenosis. *Circ Res* 90, 398-404.
- Sedding, D. G., Seay, U., Fink, L., Heil, M., Kummer, W., Tillmanns, H., and Braun-Dullaeus, R. C. (2003). Mechanosensitive p27Kip1

- regulation and cell cycle entry in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 108, 616-622.
- Sehayek, E., Shefer, S., Nguyen, L. B., Ono, J. G., Merkel, M., and Breslow, J. L. (2000). Apolipoprotein E regulates dietary cholesterol absorption and biliary cholesterol excretion: studies in C57BL/6 apolipoprotein E knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 3433-3437.
- Servant, M. J., Coulombe, P., Turgeon, B., and Meloche, S. (2000). Differential regulation of p27(Kip1) expression by mitogenic and hypertrophic factors: Involvement of transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *J Cell Biol* 148, 543-556.
- Shawver, L. K., Slamon, D., and Ullrich, A. (2002). Smart drugs: tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *Cancer Cell* 1, 117-123.
- Sheaff, R. J., Groudine, M., Gordon, M., Roberts, J. M., and Clurman, B. E. (1997). Cyclin E-CDK2 is a regulator of p27Kip1. *Genes Dev* 11, 1464-1478.
- Sherr, C. J. (1993). Mammalian G1 cyclins. *Cell* 73, 1059-1065.
- Sherr, C. J., and Roberts, J. M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13, 1501-1512.
- Shimokado, K., Yokota, T., Umezawa, K., Sasaguri, T., and Ogata, J. (1994). Protein tyrosine kinase inhibitors inhibit chemotaxis of vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb* 14, 973-981.
- Shin, I., Rotty, J., Wu, F. Y., and Arteaga, C. L. (2005). Phosphorylation of p27Kip1 at Thr-157 interferes with its association with importin alpha during G1 and prevents nuclear re-entry. *J Biol Chem* 280, 6055-6063.
- Sihvola, R., Koskinen, P., Myllärniemi, M., Loubtchenkov, M., Häyry, P., Buchdunger, E., and Lemström, K. (1999). Prevention of cardiac allograft arteriosclerosis by protein tyrosine kinase inhibitor selective for platelet-derived growth factor receptor. *Circulation* 99, 2295-2301.
- Sihvola, R. K., Tikkanen, J. M., Krebs, R., Aaltola, E. M., Buchdunger, E., Laitinen, O., Koskinen, P. K., and Lemström, K. B. (2003). Platelet-derived growth factor receptor inhibition reduces allograft arteriosclerosis of heart and aorta in cholesterol-fed rabbits. *Transplantation* 75, 334-339.
- Sjolund, M., Rahm, M., Claesson-Welsh, L., Sejersen, T., Heldin, C. H., and Thyberg, J. (1990). Expression of PDGF alpha- and beta-receptors in rat arterial smooth muscle cells is phenotype and growth state dependent. *Growth Factors* 3, 191-203.

- Somasundaram, K. (2000). Tumor suppressor p53: regulation and function. *Front Biosci* 5, D424-437.
- Speir, E., Modali, R., Huang, E. S., Leon, M. B., Shawl, F., Finkel, T., and Epstein, S. E. (1994). Potential role of human cytomegalovirus and p53 interaction in coronary restenosis. *Science* 265, 391-394.
- Spraragen, S. C., Bond, V. P., and Dahl, L. K. (1962a). DNA synthesizing cells in rabbit heart tissue after cholesterol feeding. *Circ Res* 11, 982-986.
- Spraragen, S. C., Bond, V. P., and Dahl, L. K. (1962b). Role of hyperplasia in vascular lesions of cholesterol-fed rabbits studied with thymidine-H3 autoradiography. *Circ Res* 11, 329-336.
- Spruck, C., Strohmaier, H., Watson, M., Smith, A. P., Ryan, A., Krek, T. W., and Reed, S. I. (2001). A CDK-independent function of mammalian Cks1: targeting of SCF(Skp2) to the CDK inhibitor p27Kip1. *Mol Cell* 7, 639-650.
- Stewart, N., Hicks, G. G., Paraskevas, F., and Mowat, M. (1995). Evidence for a second cell cycle block at G2/M by p53. *Oncogene* 10, 109-115.
- Sunkel, C. E., Fau de la Casa-Juana, M., Cillero, F. J., Priego, J. G., and Ortega, M. P. (1988). Synthesis, platelet aggregation inhibitory activity, and in vivo antithrombotic activity of new 1,4-dihydropyridines. *J Med Chem* 31, 1886-1890.
- Sylvester, A. M., Chen, D., Krasinski, K., and Andrés, V. (1998). Role of c-fos and E2F in the induction of cyclin A transcription and vascular smooth muscle cell proliferation. *J Clin Invest* 101, 940-948.
- Tacken, P. J., Delsing, D. J., Gijbels, M. J., Quax, P. H., Havekes, L. M., Hofker, M. H., and van Dijk, K. W. (2002). VLDL receptor deficiency enhances intimal thickening after vascular injury but does not affect atherosclerotic lesion area. *Atherosclerosis* 162, 103-110.
- Tanner, F. C., Boehm, M., Akyürek, L. M., San, H., Yang, Z.-Y., Tashiro, J., Nabel, G. J., and Nabel, E. G. (2000). Differential effects of the cyclin-dependent kinase inhibitors p27<sup>Kip1</sup>, p21<sup>Cip1</sup>, and p16<sup>Ink4</sup> on vascular smooth muscle cell proliferation. *Circulation* 101, 2022-2025.
- Tanner, F. C., Yang, Z.-Y., Duckers, E., Gordon, D., Nabel, G. J., and Nabel, E. G. (1998). Expression of cyclin-dependent kinase inhibitors in vascular disease. *Circ Res* 82, 396-403.
- Tomoda, K., Kubota, Y., Arata, Y., Mori, S., Maeda, M., Tanaka, T., Yoshida, M., Yoneda-Kato, N., and Kato, J. Y. (2002). The cytoplasmic shuttling and subsequent degradation of p27Kip1

- mediated by Jab1/CSN5 and the COP9 signalosome complex. *J Biol Chem* 277, 2302-2310.
- Tomoda, K., Kubota, Y., and Kato, J. (1999). Degradation of the cyclin-dependent-kinase inhibitor p27Kip1 is instigated by Jab1. *Nature* 398, 160-165.
- Tsui, L. V., Camrud, A., Mondesire, J., Carlson, P., Zayek, N., Camrud, L., Donahue, B., Bauer, S., Lin, A., Frey, D., *et al.* (2001). p27-p16 fusion gene inhibits angioplasty-induced neointimal hyperplasia and coronary artery occlusion. *Circ Res* 89, 323-328.
- Tsvetkov, L. M., Yeh, K. H., Lee, S. J., Sun, H., and Zhang, H. (1999). p27(Kip1) ubiquitination and degradation is regulated by the SCF(Skp2) complex through phosphorylated Thr187 in p27. *Curr Biol* 9, 661-664.
- Ueno, H., Masuda, S., Nishio, S., Li, J. J., Yamamoto, H., and Takeshita, A. (1997). Adenovirus-mediated transfer of cyclin-dependent kinase inhibitor-p21 suppresses neointimal formation in the balloon-injured rat carotid arteries in vivo. *Ann N Y Acad Sci* 811, 401-411.
- Ungermannova, D., Gao, Y., and Liu, X. (2005). Ubiquitination of p27Kip1 requires physical interaction with cyclin E and probable phosphate recognition by SKP2. *J Biol Chem* 280, 30301-30309.
- van Ree, J. H., van den Broek, W. J., Dahlmans, V. E., Groot, P. H., Vidgeon-Hart, M., Frants, R. R., Wieringa, B., Havekes, L. M., and Hofker, M. H. (1994). Diet-induced hypercholesterolemia and atherosclerosis in heterozygous apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* 111, 25-37.
- van Vlijmen, B. J., Gerritsen, G., Franken, A. L., Boesten, L. S., Kockx, M. M., Gijbels, M. J., Vierboom, M. P., van Eck, M., van De Water, B., van Berkel, T. J., and Havekes, L. M. (2001). Macrophage p53 deficiency leads to enhanced atherosclerosis in APOE\*3-Leiden transgenic mice. *Circ Res* 88, 780-786.
- Veinot, J. P., Ma, X., Jelley, J., and O'Brien, E. R. (1998). Preliminary clinical experience with the pullback atherectomy catheter and the study of proliferation in coronary plaques. *Can J Cardiol* 14, 1457-1463.
- Vlach, J., Hennecke, S., and Amati, B. (1997). Phosphorylation-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Embo J* 16, 5334-5344.
- von der Thüsen, J. H., van Vlijmen, B. J., Hoeben, R. C., Kockx, M. M., Havekes, L. M., van Berkel, T. J., and Biessen, E. A. (2002). Induction of atherosclerotic plaque rupture in apolipoprotein E-/-

- mice after adenovirus-mediated transfer of p53. *Circulation* 105, 2064-2070.
- Wan, S., George, S. J., Nicklin, S. A., Yim, A. P., and Baker, A. H. (2004). Overexpression of p53 increases lumen size and blocks neointima formation in porcine interposition vein grafts. *Mol Ther* 9, 689-698.
- Wei, G. L., Krasinski, K., Kearney, M., Isner, J. M., Walsh, K., and Andres, V. (1997). Temporally and spatially coordinated expression of cell cycle regulatory factors after angioplasty. *Circ Res* 80, 418-426.
- Weingärtner, O., Kasper, M., Reynen, K., Bramke, S., Marquetant, R., Sedding, D. G., Braun-Dullaeus, R., and Strasser, R. H. (2005). Comparative morphometric and immunohistological assessment of the development of restenosis after arterial injury and a cholesterol-rich diet in apolipoprotein E <sup>-/-</sup>mice and C57BL/6 control mice. *Coron Artery Dis* 16, 391-400.
- Yang, Z., Oemar, B. S., Carrel, T., Kipfer, B., Julmy, F., and Luscher, T. F. (1998). Different proliferative properties of smooth muscle cells of human arterial and venous bypass vessels: role of PDGF receptors, mitogen-activated protein kinase, and cyclin-dependent kinase inhibitors. *Circulation* 97, 181-187.
- Yang, Z. Y., Simari, R. D., Perkins, N. D., San, H., Gordon, D., Nabel, G. J., and Nabel, E. G. (1996). Role of the p21 cyclin-dependent kinase inhibitor in limiting intimal cell proliferation in response to arterial injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 7905-7910.
- Yonemitsu, Y., Kaneda, Y., Tanaka, S., Nakashima, Y., Komori, K., Sugimachi, K., and Sueishi, K. (1998). Transfer of wild-type p53 gene effectively inhibits vascular smooth muscle cell proliferation in vitro and in vivo. *Circ Res* 82, 147-156.
- Yoshizumi, M., Hsieh, C. M., Zhou, F., Tsai, J. C., Patterson, C., Perrella, M. A., and Lee, M. E. (1995). The ATF site mediates downregulation of the cyclin A gene during contact inhibition in vascular endothelial cells. *Mol Cell Biol* 15, 3266-3272.
- Zhang, S. H., Reddick, R. L., Burkey, B., and Maeda, N. (1994). Diet-induced atherosclerosis in mice heterozygous and homozygous for apolipoprotein E gene disruption. *J Clin Invest* 94, 937-945.
- Zhang, S. H., Reddick, R. L., Piedrahita, J. A., and Maeda, N. (1992). Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science* 258, 468-471.
- Zhou, X., Paulsson, G., Stemme, S., and Hansson, G. K. (1998). Hypercholesterolemia is associated with a T helper (Th) 1/Th2

- switch of the autoimmune response in atherosclerotic apo E-knockout mice. *J Clin Invest* *101*, 1717-1725.
- Zhu, B., Kuhel, D. G., Witte, D. P., and Hui, D. Y. (2000). Apolipoprotein E inhibits neointimal hyperplasia after arterial injury in mice. *Am J Pathol* *157*, 1839-1848.
- Zindy, F., Lamas, E., Chenivresse, X., Sobczak, J., Wang, J., Fesquet, D., Henglein, B., and Brechot, C. (1992). Cyclin A is required in S phase in normal epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* *182*, 1144-1154.
- Zou, Y., Hu, Y., Mayr, M., Dietrich, H., Wick, G., and Xu, Q. (2000). Reduced neointima hyperplasia of vein bypass grafts in intercellular adhesion molecule-1-deficient mice. *Circ Res* *86*, 434-440.



