



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

# Identificación y caracterización de genes regulados por NOR-1 (*Neuron-derived Orphan Receptor-1*): implicación en el remodelado vascular y la diferenciación celular

Beatriz Ferrán Pérez

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

TESIS DOCTORAL

**Identificación y caracterización de genes regulados por NOR-1 (*Neuron-derived Orphan Receptor-1*): implicación en el remodelado vascular y la diferenciación celular**

**Beatriz Ferrán Pérez**

Barcelona, 2016

UNIVERSIDAD DE BARCELONA  
FACULTAD DE FARMACIA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA  
METABOLISMO, SEÑALIZACIÓN METABÓLICA Y PATOLOGÍAS ASOCIADAS



**Identificación y caracterización de genes regulados  
por NOR-1 (*Neuron-derived Orphan Receptor-1*):  
implicación en el remodelado vascular  
y la diferenciación celular**

**Beatriz Ferrán Pérez  
2016**





**UNIVERSIDAD DE BARCELONA**  
**FACULTAD DE FARMACIA**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA**  
**METABOLISMO, SEÑALIZACIÓN METABÓLICA Y PATOLOGÍAS ASOCIADAS**

Memoria presentada por la Licenciada en Bioquímica Beatriz Ferrán Pérez, para optar al grado de Doctor que otorga la Universidad de Barcelona.

La presente tesis doctoral “Identificación y caracterización de genes regulados por NOR-1 (*Neuron-derived Orphan Receptor-1*): implicación en el remodelado vascular y la diferenciación celular”, se ha realizado en el Centro de Investigación Cardiovascular (CSIC-ICCC) bajo la dirección del Dr. José Martínez González (CSIC) y la Dra. M<sup>a</sup> Cristina Rodríguez Sinovas (ICCC), y actuando como tutor el Dr. Juan Carlos Laguna Egea (Universidad de Barcelona).

Los directores

El tutor

La doctoranda



***A mis padres***



# ***AGRADECIMIENTOS***



*“La ciencia tiene una gran belleza. Un científico (...) es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas”*

Marie Curie

*“Das más quizás si imaginas la fuerza que está en tu interior”*

Buena Fe

La presente tesis doctoral es el resultado de cinco años de aprendizaje. Durante este tiempo he recibido el apoyo, la ayuda y la confianza de muchas personas, sin las cuales no hubiese sido posible la realización de este proyecto.

Quisiera agradecer, en primer lugar, al Ministerio de Economía y Competitividad por otorgarme la beca JAE-Pre, y a Lina Badimon, por darme la oportunidad de desarrollar mi proyecto de tesis doctoral en el Centro de Investigación Cardiovascular.

Quiero agradecer a mis directores Pepe y Cristina no solo por haber procurado que no me faltase nada, sino también por la ayuda en el diseño de los experimentos, en la interpretación de los resultados y en la redacción de esta tesis. Gracias, Pepe, por la confianza y el esfuerzo durante los trámites para mi incorporación al centro, por el pragmatismo cuando me atascaba y las exigencias en la redacción de los artículos. Gracias, Cristina, por tu sentido práctico, por tus orientaciones con los EMSAs y las inmunos, tus consejos técnicos y tus indicaciones en la escritura.

Quisiera agradecer también a Juan Carlos Laguna por aceptar ser tutor de esta tesis y, de forma general, al claustro de profesores del Máster de Biomedicina de la Universidad de Barcelona. Quisiera agradecer a la División de Cardiología y Cirugía Cardíaca y al Servicio de Angiología, Cirugía Vascul y Endovascular, del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, por facilitarnos las muestras humanas.

Gracias, Lab 110, por acogerme desde el primer momento, por enseñarme, ayudarme y apoyarme en todos los sentidos. Más que compañeros de laboratorio han sido muy buenos amigos. Gracias, Silvia (*Sunshine*), por alegrarnos todos los días, por la música, por tu ayuda con las PCRs y mil cosas cuando había que correr, por tu disposición eterna de ayudar, por los tés y por el cajón de chuches. Gracias, Ricardo, por enseñarme tanto, por ayudarme con mis inseguridades y novatadas del inicio, por las “largas discusiones científicas”, por tu ayuda con las células, los virus, las zimos y la SMPX, por estar cerca.

Gracias, Olivier, por tu ayuda con mis primeros experimentos y por tus consejos del ChIP. Gracias, Anna, por tu sentido común, por tu metodicidad, por tus enseñanzas de histología, por tus bailes de buena suerte, por la cena de Noche Buena con tu familia y por París. Gracias, Javi, por mis primeros pasos con las lipofecciones y los siRNAs, por la supervisión en radio, por las lecciones en mi escasa experiencia en citometría, por tu carácter, tus silbidos en medio del pasillo, por tu sentido del humor constante y tus chistes malos y buenos (algunos me han hecho llorar de la risa). Gracias, María, por tu apoyo, tu palmada de ánimo muchas veces, tu preocupación en momentos difíciles, tu disposición y tus consejos. Gracias, Judith, por compartir manías e innumerables transfecciones (muchas veces fallidas), por la experiencia del EMSA, por las risas de por qué es mejor un *Smint* que un *Hall*, y por compartir la añoranza de tener lejos la familia. Gracias, Íngrid (xicoteta), por tus enseñanzas con los ratones, por tu forma de trabajar, por compartir el resultado bueno o malo de una luci, por decirme cómo debo ser muchas veces, por ser “adorablemente borde” (¡y lo sabes!). Gracias, Mar (xurri), ¡tengo tanto qué agradecerte!: tu cercanía desde el principio, tu ayuda incondicional con las células, tu estrés cuando siempre estaba contra-reloj, las caricaturas y los mensajes de ánimo, los juegos de mesa eternos, la meditación, tu forma de ver la vida, por compartir tus amigos, por Isona, por la familia de Vilanova (Rat, Manel y las avias), por tu enorme apoyo desde lejos, por la portada de esta tesis (eres una *crack*). Gracias, Saray (cariño), por tu ayuda cuando había que hacer mil cosas a la vez sin importar que fuera fin de semana, por estar hasta las tantas en el lab, por iniciarme en el mundo del *running*, por los capítulos, por el “no te rindas” y “la vida es dura”, por ese fin de semana en Valladolid con tus padres, y, sobre todo, cariño, por aguantarme en la época más difícil sin saturarte ni perder la paciencia. Quisiera agradecer a los chicos nuevos Miquel (por los ánimos) y Laia (por su ayuda cuando había experimental urgente por hacer); chicos, deseo que todo les vaya bien en el proyecto que recién acaban de empezar. También quisiera agradecer a Susana, Aina, Andrea y Diana, con las que he coincidido menos, pero que compartimos buenos momentos y risas.

Quisiera agradecer de forma muy especial a los demás integrantes del grupo “Lab 110”, que nos une comidas, chistes, cervezas (o bebidas sin alcohol), alegrías y tristezas. Gracias, David, por ayudarme a relativizar (¡tantas veces!),

por los “piropos” cotidianos, por la costumbre de mortificar, pinchar y los dobles sentidos, y por estar a mi lado cuando me quedaba una cuesta importante en mi primera excursión (que no se me olvida). Azorini, noia, gracias por tu empuje, tu carácter contagioso, tu sentido de la aventura, por tu apoyo y por estar más cerquita en esta última etapa. Gemma, tía, gracias por ser genial y por el enano recurrente de tu cabeza, por transmitirme tranquilidad, por tu consejo de que disfrute el momento, por Oslo. Gracias, Maite, por tu sonrisa y tu optimismo de siempre, por sacarme de apuros en más de una ocasión, por escuchar muchas veces. Gracias, Sonia, por estar pendiente y por tu ayuda cuando empecé a escribir. Gracias, Lourdes (Rocío), Patricia, Sergi y Teresa, por la alegría y los ánimos.

Quisiera agradecer a Esther Gerbolés por su ayuda tantas veces con las células y por las pequeñas tertulias; a las chicas del Lab 111 Elena y Laura (por su ayuda con las zimos y otras muchas cosillas), y a Aleyda, por su apoyo y preocupación (verás qué bien te irá); a Oriol y M<sup>a</sup> Angels, por el apoyo y los muchos consejos no siempre relacionados con la histología; a Sandra, por sus lecciones de PCR; a Leif, Adela, Carmen y Selma, por compartir celebraciones; a las chicas del 004 Rosa, Judit, Loli, Carmen y Alba, por dejarme usar el escáner sin importar la hora; a Olaya, Pablo, Mari Cánovas y Sonia Huertas, por facilitarme las cámaras de *Western blot* en más de una ocasión; a Rosa Aledo, por compartir experiencias en clonajes y ChIP; a Mónica Pescador y Esther Peña, por sus consejos con el confocal y la inmuno de fluorescencia; a Gemma Arderiu, por enseñarme la técnica del fosfato cálcico; a Nia y Maribel, por la gestión de Cultivos y de las guardias de congeladores; a Pepi y Meritxell, por su gran ayuda con los trámites y el papeleo de tantas veces; a María Martínez, por el trato amable y su ayuda con los pedidos; a Laura Buendía, por su amabilidad y por estar pendiente de que tengamos el material listo; a Roger, por su ayuda con los desperfectos técnicos en más de una ocasión. Muchas gracias Filo, María y Carmen, por permitir que pisara el suelo mojado muchas veces cuando eran las tantas, aún me quedaba faena y ustedes lo habían acabado de lavar; Filo, gracias por las empanadillas de queso; Carmen, gracias por malcriarme de tantas maneras diferentes. Quisiera agradecer en sentido general a los de Administración Nuria, Montse, M<sup>a</sup> José, Silvia y Joaquín, por la gestión de estos años, y a los demás trabajadores del centro por su amabilidad.

Fuera del ICCC, quisiera agradecer especialmente a Irene (bichito) por el *coaching* de tantas noches, por las paellas y el arroz al horno, por ser el Pepito Grillo, por no salir corriendo de casa cuando el estrés podía cortarse con un cuchillo, por ser nuestra ancla en más de una ocasión y por aguantarme en esta última etapa; a Mercedes, por su apoyo, por tranquilizarme y por el microscopio de tantas veces; a Eva y Montse (de Sant Pau), por su asistencia y ayuda con el confocal y las inmunos de tejidos.

Gracias a los amigos de grupo “Calçotada/Forapista”, me hubiera gustado compartir más aventuras con ustedes... espero aun estar a tiempo. Los que no he nombrado todavía: Marc, gracias por tu disposición de ayudar siempre y por tu ayuda, por las sobremesas, por estar pendiente, por la nieve y por tu niña adorable. Pablo (Pablillo), gracias por el trío Calavera, por las noches de guitarra, por enseñarme a hacer empanadillas. Lucía, cielo, gracias por tu afecto, tu apoyo y por compartir el bailar salsa y los sinsabores de este mundillo que es la ciencia, pero que nos fascina. Marcos, gracias por tu sentido del humor y las croquetas espectaculares. Gracias, Estela, por los ánimos y el “tú sí puedes”. Gracias a Mónica, Martí y Karel, por la afición por los juegos de mesa.

Quisiera agradecer a Hansel, por hacer posible esta aventura de un poco más de cinco años. Gracias, meruco, porque más que el promotor, fuiste el artífice, porque me facilitaste tantas cosas y porque sé que a pesar de todo puedo contar contigo. Gracias, María y Jesús, mis padres de este lado (icon patria potestad y todo!), por el apoyo incondicional de siempre, por estar pendientes todo el tiempo, por acogerme en Madrid tantas veces, por hacerme la maleta del viaje a Cuba, por el viaje maravilloso a Extremadura, por compartir penas y alegrías, por los regaños porque me duermo en los laureles, porque no pierden la costumbre de malcriarme.

Gracias, Yasser, por estar del otro lado del teléfono siempre, porque me has demostrado que eres incondicional, por decirme las verdades y hablar sin miramientos aunque seamos diferentes; chamaquito, gracias por cambiar mi manera de ver muchas cosas. Gracias, Mavys y Javier, por el apoyo, por estar pendientes, por el arroz al horno y la Noche Buena en Segur de Calafel, porque sé que puedo contar con ustedes en las buenas y en las malas. Anabel, niña, gracias por estar y por ser tan franca en todos los sentidos (agradezco mucho que seas así), gracias por tu apoyo y por aguantar mis quejas. Gracias a Ily, a

Elain (Flejillo) y a Karel, mis amigos de la carrera que también andan por estos lares, por estar pendientes, aunque hablemos de Pascuas a San Juan; a Cathy y Maria Elisa. Gracias a los amigos con los que tuve la suerte de convivir en Cerdanyola: Isaías, Felipe, Astrid y Lynay. Alí y Arelita, gracias por el cariño y las comidas en la casita nueva de Barcelona, cuando nos reuníamos y recordábamos viejos tiempos; Pacho, gracias por dejarte arrastrar tantas veces, por permitirme ayudarte en tu tesis, por tu cercanía y confianza. Gracias, Osmei, por compartir mis primeros tiempos viviendo en Barcelona, por animarme cuando tenía que trabajar los fines de semana (cuidar de los “helicópteros pilarines”, como tú dices), por hacerme tener un pedacito más de Cuba en casa. Gracias, Lino, por tu preocupación y tu apoyo. Gracias, Picasso, por tu apoyo en mis primeros días en Barcelona.

En este punto, quisiera agradecer a todas las personas que me han apoyado siempre del otro lado del Atlántico y cuya ayuda fue imprescindible. En primer lugar a mis padres, a quien va dedicada esta tesis. Mami, papi y Rauli, gracias por el apoyo absoluto desde el primer momento a pesar de saber que estaríamos mucho más lejos que nunca y durante más tiempo, por ser mi centro de mando, mi retaguardia, mi punto de partida en tantos aspectos; por constituir el pilar que sostiene mi estado emocional a tanta distancia; por vivir el esfuerzo y sacrificio incluso antes de empezar; por los mensajes sorpresa de apoyo, las palabras alentadoras y los “te quiero, te quiero, te quiero”; porque con ustedes la palabra “incondicional” se me hace pequeña. Gracias a mi tía Ileana por ayudar a que se hiciese realidad todo esto, porque me costó no decirte “tía” en la oficina, por regañarme por no escribir y porque me seguiste escribiendo a pesar de que soy muy vaga con los correos... ¡qué paciencia has tenido conmigo, tía! Gracias especialmente a mi abuela, mi tía Ivonne, Camilo, Fermín, Fafi y los muchachos, por el apoyo, por alentarme desde el inicio y por seguir pendientes. Gracias a mi familia de Guantánamo por estar al tanto, a mis tíos Irene, Diosito, Anita, Evita y Fe, y a mis primos Annia, Pepe, Migue y Silvito, por el apoyo y porque siempre preguntan cuándo voy a terminar la tesis e ir de vacaciones.

Gracias a mis compañeros del CNIC (donde me he formado en gran parte), que me enseñaron mucho, que estuvieron a mi lado en el inicio de todo, que vivieron el estrés junto conmigo, que han sido más que compañeros, amigos.

Gracias, mi Lú, por tu apoyo, por vivir tantas cosas juntas, por estar en el momento que más lo necesitaba, por alentarme desde tan lejos y por tu cariño. Gracias, Edicita (“te odio, te odio”), porque no se me olvida que estabas ahí cuando la mezcla mortal de cola y ron; gracias a tus papis que son de oro, al cariño de la Yuya y a las idas a Mantilla donde me sentía como en casa. Gracias, la Tale, por todo lo que me has enseñado, por tus consejos, por tu amistad y el cariño aunque nos escribamos poco. Gracias, la Karen, por tus locuras y tu sentido del humor. Gracias, Lisy, por el apoyo. Gracias a los niños Ernesto y Maikel, por lo bien que la pasábamos en la casita del Vedado, por los cortes de pelo y los temas ocurrentes. Gracias a Celso y Orlandito, por el cariño. Gracias a Josefina, por la amabilidad. Gracias a los nenes Dari y Jose, que se han hecho grandes, y a Marqui y Thiaguín, a quienes aun no conozco. Gracias a Yaumara, la Guanti y Fidel, por su ayuda con la internet.

Mil gracias, Javiquichi, porque a pesar de estar tan lejos no he dejado de recibir tus consejos y tu ayuda. Gracias, Banessa (Pipa), por tu amistad de siempre aunque hablemos poco y nos veamos menos, por hacerme sentir mejor cada vez que hablamos. Gracias, Ana (Doña Juana), por el cariño de tantos años, por estar pendiente siempre y por tus recomendaciones para lidiar con el estrés. Gracias a Enriqueta y Pedro, a Carlos, Ileana y Fide, por preguntar siempre por mí. Gracias, Sacha, Valia y Pedro, por los momentos lindos, por los chistes y el cariño.

Gracias a toda la gente en Cienfuegos, que me han ayudado y apoyado de muchas formas. A Cruz, por su gran ayuda, por la confianza y las frases de aliento. A Iris, Ceci, Milagros, Jorge Luis y todos los demás compañeros que hicieron muy agradable mi estancia en Vivienda. A Sonia, Ori y sus nenes, a Cachita y Jorge, a Melba, Rafael y las niñas, por estar pendientes. Gracias, Indira y Ori, por su ayuda con el *IMO* y el *What'sapp*. Gracias, Manolín, por estar en contacto y por las fotos que me has mandado para que extrañe menos. Gracias, Jorgito, eres tan importante para mí y me has ayudado tanto siempre! Gracias, Rachel (Michu), a ti a tu familia por el apoyo. Gracias a Buena Fe.

¡He recibido tanta ayuda! A aquellos que no he mencionado, pero que han puesto su granito de arena, MUCHAS GRACIAS.

# ***ÍNDICE***



<b>ÍNDICE.....</b>	<b>15</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>23</b>
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>27</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>33</b>
1. LA ATROSCLEROSIS.....	35
1.1. Estructura de la arteria .....	36
1.2. Evolución de la lesión aterosclerótica .....	37
1.2.1. Lesión inicial: la disfunción endotelial .....	38
1.2.2. La inflamación y el papel de las CMLV en la progresión de la placa .....	39
1.2.3. Lesión avanzada y trombosis .....	41
2. LOS RECEPTORES NUCLEARES.....	44
2.1. Clasificación .....	44
2.2. Estructura .....	47
2.3. Mecanismos de acción.....	50
2.3.1. Unión al ADN.....	50
2.3.2. Interacción con la maquinaria transcripcional.....	52
2.3.3. Interacción con co-reguladores .....	53
2.3.4. Interacción con otras vías de señalización.....	54
2.4. La familia NR4A.....	56
2.4.1. Unión al ADN.....	58
2.4.2. Estructura génica y proteica de NOR-1.....	59
2.4.3. Papel de NOR-1 en la biología vascular .....	60
2.4.4. Papel de NOR-1 en la biología del músculo esquelético.....	65
3. LAS PROTEÍNAS A2M Y SMPX.....	66
3.1. La alfa-2 macroglobulina .....	67
3.2. La SMPX .....	68
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>71</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>75</b>
1. MUESTRAS HUMANAS DE TEJIDO .....	77
2. CULTIVOS CELULARES .....	77
2.1. Cultivos primarios.....	77
2.1.1. CMLV humanas .....	77
2.1.2. CMLV murinas.....	78
2.1.3. CMLV de rata .....	79
2.1.4. HSMM ( <i>Human Skeletal Muscle Myoblasts</i> ).....	79
2.2. Líneas celulares.....	80
3. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DEL ARN MENSAJERO .....	80
3.1. Obtención de ARN total.....	80

3.1.1.	Extracción con solventes orgánicos.....	81
3.1.2.	Extracción mediante columnas de intercambio iónico .....	81
3.2.	Determinación de la cantidad y calidad de ARN .....	82
3.3.	PCR a tiempo real .....	83
3.3.1.	RT-PCR con <i>SYBR-Green</i> .....	83
3.3.2.	RT-PCR con sondas específicas.....	85
4.	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN PROTEICA .....	86
4.1.	Obtención de extractos proteicos .....	86
4.1.1.	Extracción de proteínas totales de células en cultivo .....	86
4.1.2.	Extracción de proteínas totales de sobrenadante de CMLV en cultivo .....	87
4.1.3.	Extracción de proteínas totales de tejido.....	87
4.1.4.	Extracción de proteínas nucleares y citosólicas de CMLV en cultivo ...	88
4.2.	Determinación de la concentración proteica .....	89
4.3.	<i>Western blot</i> .....	89
4.4.	Inmunocitoquímica de fluorescencia .....	92
4.4.1.	Detección mediante Microscopía Confocal.....	92
4.4.2.	Detección mediante Microscopía de Fluorescencia Convencional .....	93
4.5.	Inmunohistoquímica mediante el sistema avidina-biotina .....	94
4.5.1.	Preparación de las muestras .....	94
4.5.2.	Detección de las proteínas de interés .....	95
5.	ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD GELATINASA.....	97
5.1.	Zimografía .....	97
5.1.1.	Preparación de las muestras .....	98
5.1.2.	Electroforesis y actividad gelatinasa .....	98
5.2.	Detección de actividad gelatinasa total .....	99
5.2.1.	Preparación de las muestras .....	100
5.2.2.	Ensayo enzimático.....	100
6.	ANÁLISIS <i>IN SILICO</i> DE SECUENCIAS.....	101
7.	CLONACIÓN Y OBTENCIÓN DE ADN PLASMÍDICO .....	101
7.1.	Electroforesis de ADN.....	102
7.2.	Obtención del inserto.....	102
7.2.1.	Obtención por PCR .....	102
7.2.2.	Obtención por digestión enzimática .....	103
7.3.	Digestión del vector receptor y ligación.....	104
7.4.	Transformación bacteriana y obtención de ADN plasmídico .....	104
7.4.1.	Preparación de bacterias competentes.....	105
7.4.2.	Transformación .....	106
7.4.3.	Selección de clones y obtención de ADN plasmídico libre de endotoxinas .....	107
8.	ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL.....	108
8.1.	Obtención de las construcciones en el vector reportero .....	108
8.1.1.	Obtención por clonación .....	108

8.1.2. Mutagénesis dirigida.....	110
8.2. Transfecciones transitorias.....	111
8.3. Determinación de la actividad luciferasa.....	111
9. ENSAYOS DE UNIÓN PROTEÍNA-ADN .....	112
9.1. Ensayo de retardo de la movilidad electroforética (EMSA).....	112
9.1.1. Preparación de la sonda .....	112
9.1.2. Electroforesis y detección de los complejos ADN/proteína.....	114
9.2. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).....	114
9.2.1. Cross-link, lisis y fragmentación de la cromatina .....	115
9.2.2. Inmunoprecipitación y elución de los complejos ADN/proteína .....	116
9.2.3. Reversión del cross-link, purificación del ADN y RT-PCR .....	118
10. SOBRE-EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE TRANSDUCCIÓN LENTIVIRAL .....	119
10.1. Producción de las partículas virales.....	119
10.1.1. Construcción de los vectores de expresión lentiviral .....	120
10.1.2. Transfección y obtención de las partículas víricas.....	121
10.2. Determinación del título viral.....	121
10.3. Transducción de CMLV humanas.....	122
11. ESTUDIOS DE PROLIFERACIÓN E HIPERTROFIA CELULAR.....	123
12. SILENCIAMIENTO GÉNICO MEDIANTE ARN DE INTERFERENCIA .....	124
13. ESTUDIOS <i>IN VIVO</i> .....	125
13.1. Estabulación y supervisión de los animales.....	125
13.2. Tratamiento con LPS.....	127
13.3. Aislamiento de la aorta para la obtención de CMLV .....	128
14. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	128
15. SOLUCIONES GENERALES .....	128
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>131</b>
1. EFECTO DE LA SOBRE-EXPRESIÓN DE NOR-1 EN CMLV.....	133
1.1. Identificación de genes diferencialmente expresados en CMLV que sobre-expresan NOR-1 .....	133
1.2. Estudios de actividad transcripcional: NOR-1 modula la actividad transcripcional de MYOM1 a través de un elemento NBRE .....	136
1.3. NOR-1 se une <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> al elemento NBRE del promotor de MYOM1.....	138
2. LOS RECEPTORES NR4A REGULAN LA ACTIVIDAD DE MMP-2 Y MMP-9 EN PARTE A TRAVÉS DE LA REGULACIÓN DE A2M .....	140
2.1. Efecto de la sobre-expresión de los receptores NR4A sobre la actividad MMP en CMLV .....	140
2.2. Niveles de expresión de MMP-2 y MMP-9, y sus inhibidores TIMP-1, TIMP-2 y A2M.....	142

2.3. Unión <i>in vivo</i> de los receptores NR4A al elemento NBRE(-71/-64) del promotor de A2M.....	144
2.4. A2M se expresa en la pared vascular y su expresión basal en CMLV se regula por los receptores NR4A.....	146
2.4.1. Expresión de A2M en arterias humanas.....	146
2.4.2. El silenciamiento de los receptores NR4A reduce la expresión de A2M.....	147
2.5. El bloqueo de A2M revierte la inhibición de la actividad MMP mediada por los receptores NR4A .....	148
2.5.1. Efecto del bloqueo de A2M con un anticuerpo policlonal .....	148
2.5.2. Efecto de la inhibición de la expresión de A2M con un <i>siRNA</i> .....	150
2.6. NOR-1 modula la expresión vascular de las MMPs, pero no regula la expresión de A2M en ratón.....	151
2.6.1. Análisis de la expresión de A2M en aorta y en CMLV de ratones que sobre-expresan NOR-1.....	151
2.6.2. NOR-1 revierte la inducción de MMP-2 y MMP-9 en aorta de ratones tratados con LPS .....	153
3. NOR-1 REGULA LA EXPRESIÓN DE SMPX Y LA DIFERENCIACIÓN DE MIOBLASTOS DE MÚSCULO ESQUELÉTICO HUMANO .....	154
3.1. La sobre-expresión de NOR-1 en CMLV humanas disminuye la proliferación y provoca hipertrofia celular .....	154
3.2. NOR-1 regula los niveles de ARNm y de proteína de CALD1 y SMPX.....	156
3.3. NOR-1 se une <i>in vivo</i> a un elemento NBRE no canónico del promotor de SMPX .....	157
3.4. SMPX se expresa mayormente en músculo esquelético.....	159
3.5. El silenciamiento de NOR-1 reduce los niveles de expresión de SMPX en HSMM.....	161
3.6. La diferenciación de HSMM incrementa los niveles de expresión de SMPX de forma dependiente de NOR-1 .....	162
3.6.1. La diferenciación de HSMM incrementa los niveles de ARNm y de proteína de NOR-1 y SMPX .....	162
3.6.2. El incremento de la expresión de SMPX durante la diferenciación de HSMM depende de NOR-1 .....	164
3.6.3. El silenciamiento de NOR-1 previene la unión de este receptor al elemento NBRE del promotor de SMPX inducida por la diferenciación.....	165
3.7. El silenciamiento de NOR-1 afecta la diferenciación de HSMM de forma independiente a la expresión de SMPX.....	166
3.7.1. NOR-1 regula los niveles proteicos de los marcadores de diferenciación MyHC y p27 en HSMM.....	166
3.7.2. NOR-1 regula la morfología celular en HSMM .....	166
3.7.3. El silenciamiento de SMPX no afecta a la diferenciación de HSMM ..	167
3.8. La expresión de SMPX no es regulada por NOR-1 en ratón .....	168

<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>171</b>
1. EFECTO DE LA SOBRE-EXPRESIÓN DE NOR-1 EN CMLV. IDENTIFICACIÓN DE MYOM1 COMO GEN DIANA DE NOR-1 .....	174
2. LOS RECEPTORES NR4A REGULAN LA ACTIVIDAD DE MMP-2 Y MMP-9 EN PARTE A TRAVÉS DE LA REGULACIÓN DE A2M .....	175
3. NOR-1 REGULA LA EXPRESIÓN DE SMPX Y LA DIFERENCIACIÓN DE MIOBLASTOS DE MÚSCULO ESQUELÉTICO HUMANO .....	179
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>185</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>189</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>209</b>
1. ANEXO I .....	211
2. ANEXO II .....	235



# ***RESUMEN***



Las enfermedades cardiovasculares constituyen la primera causa de muerte a nivel mundial. El común denominador de las enfermedades cardiovasculares de componente isquémico es la aterosclerosis. La complicación trombótica de las placas ateroscleróticas puede ocasionar eventos clínicos como el infarto agudo de miocardio o los accidentes cerebrovasculares. En la evolución de esta patología juegan un papel clave las células musculares lisas de la pared vascular, que experimentan cambios importantes en su fenotipo y en su patrón de expresión génica. En la regulación de dichos cambios participa la familia de receptores nucleares NR4A. Los receptores NR4A (NOR-1, Nurr1 y Nur77) están codificados por genes de respuesta temprana, cuya expresión se induce por estímulos mitogénicos, pro-inflamatorios y pro-aterogénicos. Nuestro grupo identificó a NOR-1 (NR4A3) como un factor de transcripción implicado en la cardiopatía isquémica y en la migración, la proliferación y la supervivencia de las células vasculares. Actualmente se desconoce la identidad de la mayoría de los genes diana de NOR-1. Los objetivos principales de este proyecto fueron la identificación de genes regulados por NOR-1 a nivel vascular y la caracterización de los mecanismos moleculares por los cuales este receptor regula su expresión.

En estudios de expresión génica diferencial en células musculares lisas que sobre-expresaban los receptores NR4A, identificamos un conjunto de genes cuya expresión se modulaba significativamente. Mediante diferentes estrategias confirmamos a MYOM1, A2M y SMPX como potenciales genes diana de NOR-1. MYOM1 codifica para la miomesina 1, una proteína implicada en la contracción de las fibras musculares. La alfa-2 macroglobulina (A2M) es una anti-proteinasa de amplio espectro presente en el plasma de los vertebrados. La regulación de A2M tiene lugar mediante la unión de los receptores NR4A a un elemento NBRE presente en su promotor. Los receptores NR4A modulan la actividad de las metaloproteinasas MMP-2 y MMP-9 a través de diferentes mecanismos, entre ellos mediante la inducción de la expresión de A2M. Además evidenciamos que la A2M se expresa de forma relevante en las células musculares de la capa media de las arterias humanas. Por su parte, el gen

## **RESUMEN**

---

SMPX (*Small Muscle Protein X-linked*) codifica para una proteína asociada al citoesqueleto que se expresa sobre todo en células de músculo esquelético y cardíaco. La regulación de SMPX por NOR-1 se produce a través de un elemento NBRE no canónico. La diferenciación de mioblastos humanos de músculo esquelético (HSMM) a miotubos incrementa la expresión y los niveles de SMPX de forma dependiente de NOR-1. El silenciamiento de NOR-1, pero no el de SMPX, inhibe el proceso de diferenciación de las células HSMM.

# ***ABREVIATURAS***



<b>2DBD-NR</b>	<i>2 DNA-binding domains nuclear receptor</i>
<b>A2M</b>	<i>Alfa-2 macroglobulina</i>
<b>ABC</b>	<i>Avidin/Biotin complex</i>
<b>ADAMTS-7/-12</b>	<i>A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 7/12</i>
<b>ADN</b>	<i>Ácido desoxirribonucleico</i>
<b>ADNc</b>	<i>ADN complementario</i>
<b>AF-1/2</b>	<i>Activation Function 1/2</i>
<b>AHA</b>	<i>American Heart Association</i>
<b>AP-1/2</b>	<i>Activating Protein 1/2</i>
<b>ARN</b>	<i>Ácido ribonucleico</i>
<b>ARNm</b>	<i>ARN mensajero</i>
<b>ARNr</b>	<i>ARN ribosomal</i>
<b>ATP</b>	<i>Adenosine triphosphate</i>
<b>BCA</b>	<i>Bicinchoninic Acid</i>
<b>bFGF</b>	<i>Basic fibroblast growth factor</i>
<b>BSA</b>	<i>Bovine Serum Albumin</i>
<b>C2C12</b>	<i>Mouse myoblast cell line, from the thigh muscle of C3H mice after a crush injury</i>
<b>CCL20</b>	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 20</i>
<b>CD36</b>	<i>Cluster of Differentiation 36</i>
<b>CBP</b>	<i>CREB-Binding Protein</i>
<b>CE</b>	<i>Célula(s) endotelial(es)</i>
<b>ChIP</b>	<i>Chromatin Immunoprecipitation</i>
<b>ciAP2</b>	<i>cellular Inhibitor of Apoptosis Protein 2</i>
<b>CIP</b>	<i>Coctel de inhibidores de proteasas</i>
<b>cJNK</b>	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
<b>CMLV</b>	<i>Célula(s) muscular(es) lisa(s) vascular(es)</i>
<b>COUP-TF</b>	<i>Chicken Ovalbumin upstream promoter-transcription factor</i>
<b>COX-2</b>	<i>Ciclooxigenasa 2</i>
<b>CREB</b>	<i>cAMP Response Element Binding Protein</i>
<b>c.s.p.</b>	<i>Cantidad suficiente para</i>
<b>CTE</b>	<i>C-terminal extension</i>
<b>Cx40/43</b>	<i>Connexin 40/43</i>
<b>DAB</b>	<i>Diaminobencidina</i>
<b>DAX1</b>	<i>Dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1</i>
<b>DBD</b>	<i>DNA Binding Domain</i>
<b>DEPC</b>	<i>Diethyl pyrocarbonate</i>
<b>dNTP</b>	<i>Desoxirribonucleótidos trifosfato</i>
<b>EDTA</b>	<i>Ethylene Diamine Tetraacetic Acid</i>

## ABREVIATURAS

---

EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFP/GFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
EGTA	<i>Ethylene Glycol Tetraacetic Acid</i>
eNOS	<i>endothelial Nitric Oxide Synthase</i>
ER	<i>Estrogen Receptor</i>
ER $\alpha$ / $\beta$	<i>Estrogen Receptor alpha/beta</i>
ERE	<i>Elemento de respuesta a estrógenos</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GHF-1	<i>Growth hormone factor 1</i>
GLUT4	<i>Glucose Transporter 4</i>
GR	<i>Glucocorticoid receptor</i>
GRE	<i>Glucocorticoid response element</i>
GTF	<i>General Transcription Factors</i>
HAT	<i>Histone acetyltransferase</i>
HRE	<i>Hormone response element</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule-1</i>
I $\kappa$ B $\alpha$	<i>NF-<math>\kappa</math>B inhibitor alpha</i>
IFN $\gamma$	<i>Interferón gamma</i>
IgG	<i>Inmunoglobulina G</i>
IL-1/1 $\beta$ /6/8	<i>Interleuquina-1/1<math>\beta</math>/6/8</i>
JAK1/2	<i>Janus kinase 1/2</i>
LB	<i>Luria Bertani</i>
LBD	<i>Ligand binding domain</i>
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LPS	<i>Lipopolysaccharide</i>
LRP1	<i>Low density lipoprotein receptor-related protein 1</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
MCS	<i>Multi Cloning Site</i>
M-CSF	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>
MEF-2	<i>Myocyte enhancer factor-2</i>
MMP	<i><u>M</u>atrix <u>m</u>etallo<u>p</u>roteinase</i>
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
MOPS	<i>3-Morpholinopropane-1-sulfonic acid</i>
MyoD	<i>Myoblast Determination Protein 1</i>
NBRE	<i>NGFI-B Response Element</i>
NCoR	<i>Nuclear receptor co-repressor</i>
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T-cells</i>

<b>NF-κB</b>	<i>Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
<b>NGF</b>	<i>Nerve growth factor</i>
<b>NGFI-B/Nur77</b>	<i>Nerve Growth Factor 1B</i>
<b>nGRE</b>	<i>negative Glucocorticoid Response Element</i>
<b>Nkx-2.5</b>	<i>NK2 homeobox 5</i>
<b>nTRE</b>	<i>negative Thyroid Response Element</i>
<b>NO</b>	<i>Nitric Oxid</i>
<b>NOR-1/NR4A3</b>	<i>Neuron-derived Orphan Receptor-1 / NR4A member 3</i>
<b>Nppa</b>	<i>Natriuretic peptide A</i>
<b>NSL</b>	<i>Nuclear localization signal</i>
<b>NuRE</b>	<i>Nur-Response Element</i>
<b>Nurr1/NR4A2</b>	<i>Nuclear receptor related 1 protein</i>
<b>Oct-1</b>	<i>Octamer transcription factor 1</i>
<b>oxLDL</b>	<i>oxidized LDL</i>
<b>p300</b>	<i>E1A binding protein p300</i>
<b>PBS</b>	<i>Phosphate-buffered saline</i>
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b>PDGF</b>	<i>Platelet-derived growth factor</i>
<b>PDGF-BB</b>	<i>Platelet-derived growth factor beta (homodimer)</i>
<b>PLB</b>	<i>Passive Lysis Buffer</i>
<b>POMC</b>	<i>Pro-opiomelanocortin</i>
<b>PPAR</b>	<i>Peroxisome proliferator-activated receptors</i>
<b>PPARα</b>	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor alpha</i>
<b>PPARγ</b>	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
<b>PR</b>	<i>Progesterone receptor</i>
<b>PTCA</b>	<i>Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty</i>
<b>PVDF</b>	<i>Polyvinylidene Difluoride</i>
<b>RAR</b>	<i>Retinoic Acid Receptor</i>
<b>RIP-140</b>	<i>Receptor-Interacting Protein-140</i>
<b>RSRFC4</b>	<i>Myocyte enhancer factor 2A (MEF2A)</i>
<b>RXR</b>	<i>Retinoid X Receptor</i>
<b>SD</b>	<i>Standard Deviation</i>
<b>SDS</b>	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
<b>SDS-PAGE</b>	<i>SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
<b>SEM</b>	<i>Standard Error of the Mean</i>
<b>SFCA</b>	<i>Surfactant-Free Cellulose Acetate</i>
<b>siRNA</b>	<i>small interfering RNA</i>
<b>Skp2</b>	<i>S Phase Kinase-associated Protein 2</i>
<b>SMPX</b>	<i>Small Muscle Protein, X-Linked</i>
<b>SMRT</b>	<i>Silencing Mediator for Retinoid or Thyroid-hormone receptors</i>
<b>SOB</b>	<i>Super Optimal Broth</i>

## ABREVIATURAS

---

<b>SOC</b>	<i>SOB with Catabolite repression</i>
<b>SR</b>	<i>Scavenger Receptor</i>
<b>SR-A</b>	<i>Steroid Receptor RNA Activator</i>
<b>SRC-1</b>	<i>Steroid Receptor Co-activator-1</i>
<b>SREBP-1c</b>	<i>Sterol Regulatory Element-Binding Protein-1c</i>
<b>STAT3/5b</b>	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3/5b</i>
<b>TAF</b>	<i>Tightly Associated Factor</i>
<b>TBP</b>	<i>TATA-binding protein</i>
<b>TBS</b>	<i>Tris-buffered saline</i>
<b>TFIIA/IIIB/IIID/IIIE/IIIF/IIH</b>	<i>Transcription factor IIA/IIIB/IIID/IIIE/IIIF/IIH</i>
<b>TGF-<math>\beta</math>1</b>	<i>Transforming growth factor beta 1</i>
<b>Th1</b>	<i>T helper cell Type 1</i>
<b>TIF2</b>	<i>Transcriptional mediators-Intermediary Factor 2</i>
<b>tPA</b>	<i>Tissue plasminogen activator</i>
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>
<b>TR</b>	<i>Thyroid Receptor</i>
<b>TRACP</b>	<i>Tartrate Resistant Acid Phosphatase</i>
<b>TRAF</b>	<i>TNF receptor-associated factor</i>
<b>TRAM-1</b>	<i>Thyroid hormone receptor activator molecule 1</i>
<b>TRAP/DRIP/ARC</b>	<i>Thyroid hormone Receptor-Associated Proteins/ Vitamin D Receptor-Interacting Proteins/ Activator-Recruited Co-factor</i>
<b>TRIP</b>	<i>TRAF-interacting protein</i>
<b>TSH</b>	<i>Thyroid Stimulating Hormone</i>
<b>UCP3</b>	<i>Uncoupling Protein 3</i>
<b>uPA</b>	<i>Urokinase-type plasminogen activator</i>
<b>UTP</b>	<i>Uridine 5'-Triphosphate</i>
<b>VCAM-1</b>	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule-1</i>
<b>VEGF</b>	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
<b>vWF</b>	<i>Von Willebrand factor</i>
<b>XRE</b>	<i>Xenobiotic Response Element</i>

# ***INTRODUCCIÓN***



## 1. LA ATEROSCLEROSIS

La aterosclerosis (del griego *athéro*: 'pasta', y *sklerós*: 'duro') se describe como una enfermedad inflamatoria crónica que afecta principalmente a las arterias de mediano y gran calibre, y que se caracteriza por la presencia de una placa de ateroma.<sup>1,2</sup>

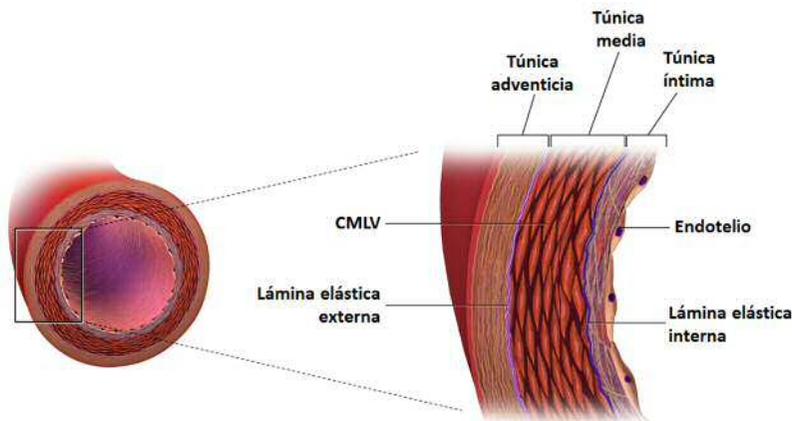
Durante parte de los siglos XIX y XX, se enfrentaron dos teorías principales que intentaron explicar el origen y las causas de la aparición y el desarrollo de la placa de ateroma. La "teoría trombogénica" sugería que el engrosamiento de la íntima, previo a la acumulación lipídica, era debido a una deposición de fibrina organizada. Por otro lado, la "teoría inflamatoria" postulaba que esta enfermedad era el resultado de un proceso inflamatorio de la íntima y un engrosamiento fibroso, inducido por la proliferación de células del tejido conectivo.<sup>3</sup> Esta segunda teoría sentó las bases de la hipótesis actual, conocida como "teoría de respuesta a la lesión", y que define la aterosclerosis como una enfermedad crónica multifactorial de tipo inflamatorio y fibroproliferativo, originada como respuesta a un daño en el endotelio.<sup>2</sup> El daño de la monocapa de células endoteliales (CE) conduce a la infiltración de diferentes tipos celulares, como macrófagos y linfocitos T, en el espacio sub-endotelial. Posteriormente se produce la proliferación y migración de las células musculares lisas vasculares (CMLV) de la capa media a la luz del vaso, y la deposición de material lipídico, calcio y matriz extracelular, que contribuye a la formación de la placa de ateroma.<sup>1</sup>

Esta enfermedad generalmente se complica por la fisura, la erosión o la rotura de la placa, y la formación de un trombo, que puede llegar a provocar isquemia y, en caso de prolongarse, necrosis del tejido afectado, de ahí que también se utilice el término de enfermedad aterotrombótica. La manifestación clínica depende del lecho vascular afectado, así se habla del síndrome coronario agudo, el infarto agudo de miocardio o la muerte súbita; en el cerebro cursa clínicamente como un accidente cerebrovascular agudo o como un accidente isquémico transitorio, mientras que en las arterias periféricas origina la claudicación intermitente o la isquemia aguda de los miembros inferiores.<sup>4</sup>

Numerosos estudios epidemiológicos han establecido que los principales factores de riesgo aterosclerótico son la hipercolesterolemia, la hipertensión, la diabetes mellitus, el tabaquismo, las alteraciones genéticas, niveles de homocisteína elevados, e infecciones (como las provocadas por *Chlamydia pneumoniae* o por *Herpes virus*). Es por ello que se considera la aterosclerosis como una enfermedad multifactorial, hecho que complica su estudio, prevención y tratamiento.

### 1.1. Estructura de la arteria

Las arterias de mediano y gran calibre son sensibles al desarrollo de las lesiones ateroscleróticas. La pared de estos vasos está formada por tres túnicas o capas (la íntima, la media y la adventicia), separadas entre sí por láminas elásticas (Fig. I1).



**Figura I1. Representación esquemática de la estructura de la pared de una arteria.** Se indican las diferentes túnicas, láminas elásticas y el endotelio. CMLV: células musculares lisas vasculares. Adaptado de *Blausen.com staff*. "Blausen gallery 2014".

La íntima o capa interna está en contacto directo con la sangre. Se compone de una monocapa de CE, una lámina basal de tejido fibroelástico, y un espacio sub-endotelial. La íntima constituye una barrera de permeabilidad

selectiva entre los componentes sanguíneos y el tejido vascular, a la vez que ejerce un papel activo en la regulación de la homeostasis vascular.

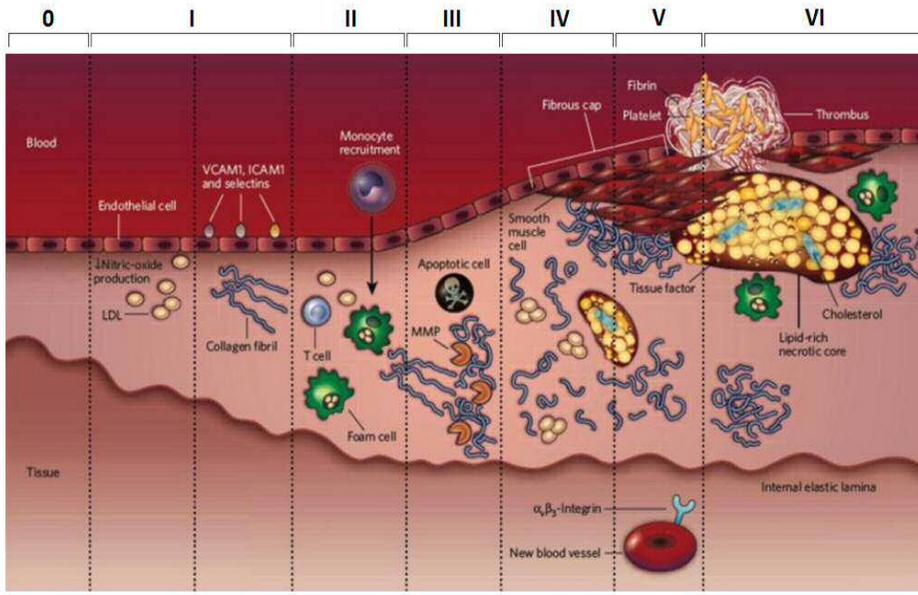
La media o capa intermedia es la de mayor grosor y se encarga de mantener el tono vascular. Está compuesta principalmente por CMLV, fibras elásticas y fibras de colágeno, en proporciones variables según el tipo de arteria.

La adventicia es la capa más externa y está formada principalmente por matriz extracelular (con fibras de colágeno) y fibroblastos. En arterias de más de 0,5 mm de diámetro de lumen, la adventicia sirve de soporte a las terminaciones nerviosas y los *vasa vasorum*, una red de pequeños vasos que se encargan de aportar nutrientes y oxígeno a la pared arterial, y que sirve de conexión entre las capas internas de la pared y los tejidos circundantes.

### **1.2. Evolución de la lesión aterosclerótica**

La formación de placas ateroscleróticas en la aorta comienza en la infancia. En las arterias coronarias se inicia aproximadamente durante la segunda década de vida, y en las arterias cerebrales, en la tercera o cuarta décadas. Estas lesiones iniciales permanecen asintomáticas durante años, pero con el tiempo pueden evolucionar hacia lesiones inestables y generar episodios clínicos agudos como accidentes cerebrovasculares o infartos de miocardio, promovidos en muchos casos por la ruptura de la placa y la consiguiente trombosis y oclusión de la arteria.<sup>5</sup>

En el desarrollo de la lesión aterosclerótica se han definido seis fases o etapas diferentes (Fig. 12), según la Asociación Americana del Corazón (AHA, *American Heart Association*). Brevemente, se inicia con una disfunción del endotelio y la activación de CE (fase I); tiene lugar el infiltrado de células inflamatorias al espacio sub-endotelial (fase II); se incrementa la proteólisis y fenómenos apoptóticos en el sub-endotelio (fase III); comienza la formación del núcleo lipídico y la cubierta fibrosa (fase IV); tiene lugar la formación de pequeños vasos sanguíneos que aportan nutrientes a la placa (fase V); y finalmente puede producirse la ruptura de la placa y la consecuente formación de un trombo (fase VI).<sup>6</sup>



**Figura 12. Representación esquemática simplificada del desarrollo de la lesión aterosclerótica.** Se indican en números romanos las fases de la evolución de la lesión según la AHA. 0: referencia de vaso sano. Se indican además las moléculas, células y estructuras más importantes en cada una de las etapas. Adaptado de *Orbay et al (2013)*.<sup>6</sup>

### 1.2.1. Lesión inicial: la disfunción endotelial

El endotelio vascular se considera un órgano multifuncional capaz de realizar funciones críticas de la fisiología vascular, al modular sus propiedades en respuesta a un amplio rango de estímulos.<sup>7</sup> Además de constituir una barrera física selectiva entre la pared vascular y los componentes de la sangre, libera sustancias que contribuyen al mantenimiento de la homeostasis del vaso. Participa en el control del tono vascular al regular la expresión de sustancias vasodilatadoras como el óxido nítrico (NO, *Nitric Oxide*) y la prostaglandina I<sub>2</sub>, o vasoconstrictoras como la endotelina, el tromboxano A<sub>2</sub> y la angiotensina II.<sup>8</sup> En condiciones normales, el endotelio tiene propiedades anti-trombóticas mediante la secreción de moléculas que inhiben la agregación plaquetaria como el NO y la heparina, aunque también puede liberar sustancias pro-agregantes como el vWF, o pro-coagulantes como el factor tisular. También ejerce un efecto anti-proliferativo sobre las

CMLV, y regula la adhesión de leucocitos a través de la expresión de los genes que codifican para proteínas de adhesión como la VCAM-1 y la E-selectina.<sup>8</sup>

La disfunción endotelial es la primera manifestación de la aparición de la lesión aterosclerótica. En respuesta a un daño provocado por estímulos proaterogénicos, se altera el funcionamiento normal del endotelio, como resultado de un cambio profundo en el patrón de expresión génica de las CE. Factores de riesgo como la hipercolesterolemia y la hipertensión arterial causan disfunción endotelial y facilitan la entrada de lipoproteínas de baja densidad (LDL, *Low Density Lipoprotein*) al espacio sub-endotelial, sobre todo en zonas de mayor estrés hemodinámico como en las curvaturas y bifurcaciones de las arterias. La biodisponibilidad del NO se reduce notablemente debido en parte a la inhibición de la enzima responsable de su síntesis, la eNOS,<sup>8,9</sup> lo que compromete las funciones vasoprotectoras del endotelio y favorece la infiltración de LDL y otros componentes del plasma. Al interactuar con los componentes de la matriz extracelular (principalmente con proteoglicanos), las LDL pueden sufrir alteraciones como oxidación, lipólisis, proteólisis y agregación. Las LDL modificadas resultantes, como las LDL oxidadas (oxLDL, *oxidized LDL*), potencian la inflamación y la formación de “células espumosas”.<sup>2,10</sup> En las CE aumenta la expresión de moléculas de adhesión como la P-selectina, la E-selectina, la ICAM-1 y la VCAM-1,<sup>11,12</sup> lo que favorece la adhesión de los leucocitos circulantes y su infiltración en la pared vascular, perpetuando así el estado inflamatorio crónico característico.

### 1.2.2. La inflamación y el papel de las CMLV en la progresión de la placa

#### ***La inflamación***

En el inicio y la progresión del proceso aterosclerótico subyace un estado inflamatorio crónico en la pared arterial. La infiltración de LDL provoca que las CE y las CMLV liberen moléculas quimioatrayentes como MCP-1 e IL-8, que favorecen el reclutamiento de células inflamatorias como monocitos y linfocitos T, e induce la expresión de moléculas de adhesión.<sup>13</sup> De este

modo, se favorece la interacción de los leucocitos circulantes con la superficie del endotelio y su posterior infiltración en el espacio sub-endotelial. Una vez en el espacio sub-endotelial, los monocitos infiltrados pueden proliferar y diferenciarse a macrófagos mediante la acción de factores como el M-CSF, secretado por las propias CE.<sup>14</sup> Estos macrófagos expresan en su superficie receptores como SR-A y CD36, que captan las LDL modificadas.<sup>15</sup> Asimismo, tanto las CE como los macrófagos producen especies reactivas del oxígeno y enzimas como mieloperoxidasas, esfingomielinasas y fosfolipasas, que contribuyen a la modificación de las LDL y facilitan la captación de estas lipoproteínas modificadas por los macrófagos.<sup>16,17</sup> Durante este proceso de captación, los macrófagos acumulan grandes cantidades de material lipídico (en su mayoría ésteres de colesterol), y se transforman en “células espumosas”. Estas células forman un tipo de lesión apreciable a simple vista conocida como “estría grasa”.<sup>2</sup>

Además de la presencia de macrófagos, en las lesiones se han detectado otras células inflamatorias como linfocitos T y, ocasionalmente, linfocitos B. Las células T (en particular Th1) son activadas por los antígenos presentados en la superficie de los macrófagos y liberan IFN $\gamma$  al espacio extracelular, lo cual promueve la activación de los macrófagos y las CMLV.

### ***Papel de las CMLV***

Las CMLV constituyen la capa media de las arterias y tienen como funciones esenciales sintetizar matriz extracelular, mantener la integridad y la elasticidad de la arteria, e intervenir en la reparación del vaso cuando se produce un daño.<sup>18</sup> La capacidad contráctil de estas células les permite modular el tono vascular según las necesidades de aporte de sangre a los órganos.

En condiciones normales, las CMLV muestran una baja actividad proliferativa y de síntesis de matriz. Estas células muestran un fenotipo contráctil caracterizado por la elevada expresión de proteínas como la actina, la miosina y la calponina,<sup>19</sup> y por la capacidad de responder a estímulos vasoconstrictores o vasodilatadores. Sin embargo, en determinadas

condiciones las CMLV pueden cambiar su patrón de expresión génica y adquirir un fenotipo sintético.<sup>18</sup> Este fenotipo se caracteriza por un aumento de la actividad proliferativa y la síntesis de componentes de matriz extracelular (como colágeno, elastina, fibronectina, o proteoglicanos), así como de la capacidad de migrar desde la capa media hacia la luz del vaso.<sup>20,21</sup>

La “estría grasa” puede evolucionar hacia una lesión intermedia y, posteriormente, hacia la placa de ateroma. En esta evolución juegan un papel esencial las CMLV que, al adquirir un fenotipo sintético, son las responsables del remodelado vascular que da lugar a la formación de una cubierta fibrosa. Las CMLV responden a diversas moléculas, muchas de las cuales son secretadas por las CE activadas, las plaquetas y las células inflamatorias;<sup>18,22</sup> tal es el caso de factores de crecimiento como el PDGF y el FGF, y otras moléculas como la endotelina, la IL-1 $\beta$  y el IFN $\gamma$ .<sup>2,22</sup> Igualmente, la presencia de LDL modificadas, homocisteína, especies reactivas del oxígeno y la alteración de los componentes de la matriz extracelular, también contribuye al cambio fenotípico de las CMLV.<sup>23-26</sup> Por otro lado, las metaloproteinasas de matriz extracelular (MMP, *Matrix Metalloproteinase*) expresadas por macrófagos, CE y las propias CMLV, favorecen el proceso migratorio de estas células y la formación de neoíntima.<sup>27-29</sup>

Las CMLV también contribuyen al mantenimiento del estado inflamatorio crónico en la placa aterosclerótica. Al ser activadas, estas células expresan y secretan citoquinas pro-inflamatorias como el TNF $\alpha$  y la IL-1.<sup>21,30</sup> Además, también pueden transformarse en “células espumosas” mediante la captación de LDL modificadas a través de receptores como el LRP1 y el CD36.<sup>31-33</sup>

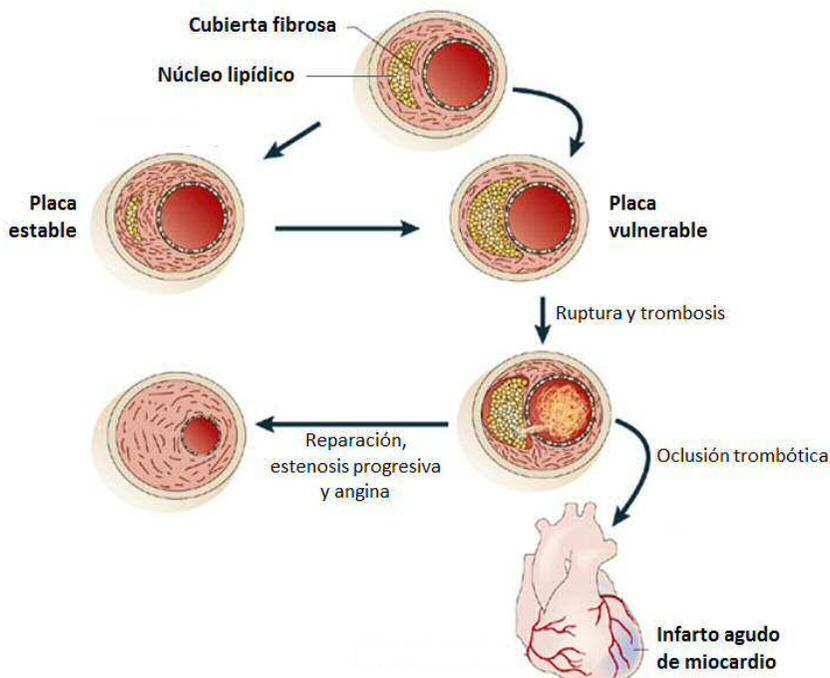
### 1.2.3. Lesión avanzada y trombosis

La lesión fibrótica puede progresar a una lesión avanzada caracterizada por un gran engrosamiento de la pared, debido principalmente a la acumulación de matriz extracelular. La producción de componentes de matriz por las CMLV es potenciada por factores como el PDGF y el TGF- $\beta$ 1, que promueven

## INTRODUCCIÓN

la síntesis de colágeno. Esta acumulación progresiva de células, matriz y lípidos genera una placa formada por una cubierta fibrosa que rodea a un núcleo lipídico.<sup>2</sup>

Las lesiones ateroscleróticas pueden evolucionar hacia una placa estable, con una disminución de la luz del vaso y la consecuente reducción del flujo sanguíneo que provoca síntomas asociados a una angina estable.<sup>34</sup> Sin embargo, en muchas ocasiones la placa evoluciona hacia una placa inestable que puede llegar a romperse y ocasionar un evento clínico debido a la formación de un trombo<sup>1</sup> (Fig. 13). Dichos eventos dependen más de la vulnerabilidad de la placa que del grado de estenosis, de modo que se ha intentado identificar los mecanismos por los cuales una placa puede llegar a romperse.



**Figura 13. Representación esquemática de la evolución de una lesión hacia una placa estable o hacia una placa vulnerable.** Se indican además los eventos que pueden conducir a una angina estable o a una manifestación clínica como el infarto agudo de miocardio. Adaptado de *Watkins et al (2006)*.<sup>34</sup>

La estabilidad de la placa está estrechamente relacionada con su composición en lípidos, matriz extracelular y células inflamatorias. Las placas con mayor susceptibilidad a romperse se caracterizan por una cubierta fibrosa fina con un contenido pobre en elastina y colágeno, y un núcleo lipídico importante<sup>35</sup> (Fig. 13). En ese núcleo lipídico se acumulan “células espumosas” que mueren por procesos apoptóticos y necróticos debido a la toxicidad de la carga lipídica, citoquinas pro-apoptóticas y elementos oxidativos. La cubierta fibrosa se debilita además por la activación de las MMP<sup>36</sup> y la apoptosis de las CMLV.<sup>37-39</sup>

El engrosamiento de la placa aterosclerótica y la alta tasa de consumo de oxígeno de las “células espumosas” genera hipoxia en las áreas más internas de la lesión.<sup>40,41</sup> Ello induce la formación de nuevos vasos en la placa.<sup>42</sup> Sin embargo, los nuevos vasos formados son débiles y propensos a la ruptura, por lo que pueden causar hemorragias y comprometer la estabilidad de la placa.<sup>43</sup>

En fases muy avanzadas, puede producirse la calcificación de la lesión aterosclerótica, que provoca la rigidez de la pared arterial debido a una acumulación de células con características similares a los condrocitos.<sup>44,45</sup> Dichas células son el resultado de cambios en la expresión génica en las CMLV, que producen la diferenciación de éstas a células osteoblásticas.<sup>46</sup> El nivel de calcificación o *calcium score* se considera un indicador de la “carga” de aterosclerosis de un individuo, por lo que se considera un marcador de riesgo.

### **2. LOS RECEPTORES NUCLEARES**

Los receptores nucleares son factores de transcripción que, como tales, tienen la capacidad de unirse a elementos de respuesta específicos presentes en los promotores de sus genes diana y de regular la expresión en respuesta a señales intra- y extra-celulares.<sup>47</sup> Constituyen una amplia familia y juegan un papel importante en funciones biológicas diversas como el desarrollo embrionario, la inflamación, el mantenimiento de la homeostasis, la proliferación y la diferenciación celular.<sup>48</sup> La disfunción o las alteraciones tanto en la estructura como en la vía de acción de estos receptores pueden estar relacionadas con procesos patológicos como el cáncer, o con enfermedades metabólicas como la obesidad y la diabetes.

La identificación del primer receptor nuclear tuvo lugar en los años 60 del pasado siglo,<sup>49</sup> y dos décadas después se logró clonar varios de ellos.<sup>50-58</sup> Desde entonces, se han identificado hasta 48 receptores nucleares humanos diferentes, que regulan la transcripción a través de diversos mecanismos de acción.<sup>59</sup>

#### **2.1. Clasificación**

La activación de los receptores nucleares puede producirse cuando al receptor que permanece inactivo en el citoplasma se une un activador, normalmente una molécula lipofílica (ligando) capaz de atravesar las membranas celulares.<sup>60</sup> Estos receptores son denominados receptores “clásicos” o receptores nucleares hormonales, pues la mayoría de sus ligandos como los esteroides (cortisol, testosterona, estradiol), los retinoides (vitamina A y derivados), las hormonas tiroideas y la vitamina D3, son de naturaleza hormonal. Otros ligandos provienen del metabolismo lipídico, como los ácidos grasos, los leucotrienos, las prostaglandinas y otros derivados del colesterol como los ácidos biliares.<sup>61</sup>

Sin embargo, existe otro tipo de receptores denominados receptores “huérfanos”, de los cuales se desconoce el ligando, bien porque todavía no

se ha identificado o porque carecen de él.<sup>59</sup> Estos receptores constituyen un grupo muy diverso. Presentan notables diferencias en sus dominios funcionales, que les proporciona una gran diversidad en su modo de acción y en sus funciones biológicas,<sup>59</sup> por lo que el único parámetro que los relaciona es la ausencia de ligando conocido.

Se postula que los receptores nucleares ancestrales eran constitutivamente activos, como sucede con los receptores nucleares “huérfanos” carentes de ligando, y que la necesidad de unión a un ligando pudo haberse adquirido a lo largo de la evolución.<sup>62</sup> En los últimos años, el creciente interés suscitado por esa clase de receptores ha permitido la identificación de los ligandos de algunos de ellos, como los PPAR<sup>63</sup> y los RXR,<sup>60</sup> inicialmente considerados “huérfanos”.

La organización estructural de los receptores nucleares está conservada evolutivamente. Estudios filogenéticos han establecido que la amplia familia de receptores nucleares provienen de un ancestro común<sup>64</sup> y que, según la homología entre sus secuencias, se agrupan en seis clases o familias (de la I a la VI) y un séptimo grupo misceláneo, compuesto por los receptores DAX1 y 2DBD-NR.<sup>62,65</sup> En la Tabla I1 se muestran los receptores que componen las seis familias siguientes:

**Familia I:** Receptores semejantes a los receptores de hormonas tiroideas

**Familia II:** Receptores semejantes a los receptores X retinoides

**Familia III:** Receptores semejantes a los receptores de estrógenos

**Familia IV:** Receptores semejantes a los factores de crecimiento nervioso IB

**Familia V:** Receptores semejantes a los factores esteroideogénicos

**Familia VI:** Receptores semejantes a los factores nucleares de células germinales

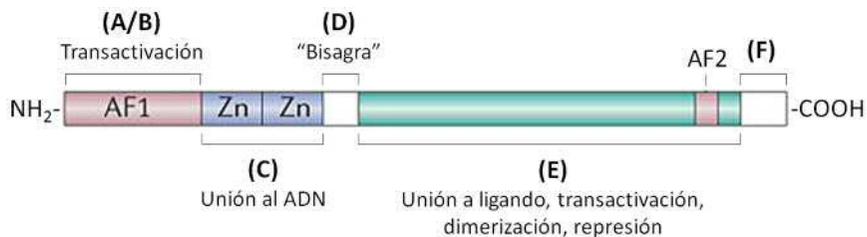
## INTRODUCCIÓN

**Tabla I1. Composición de las seis familias de receptores nucleares humanos descritos y sus ligandos correspondientes (si existe), de acuerdo con criterios filogenéticos.**

Familia	Grupo	Símbolo	Abreviatura	Ligando
I	A	NR1A1	TR $\alpha$	Hormona tiroidea
		NR1A2	TR $\beta$	
	B	NR1B1	RAR $\alpha$	Vitamina A y compuestos relacionados
		NR1B2	RAR $\beta$	
		NR1B3	RAR $\gamma$	
	C	NR1C1	PPAR $\alpha$	Ácidos grasos, prostaglandinas
		NR1C2	PPAR $\beta/6$	
		NR1C3	PPAR $\gamma$	
	D	NR1D1	Rev-ErbA $\alpha$	Hemo
		NR1D2	Rev-ErbA $\beta$	
F	NR1F1	ROR $\alpha$	Melatonina, colesterol, ácido transretinoico	
	NR1F2	ROR $\beta$		
	NR1F3	ROR $\gamma$		
H	NR1H3	LXR $\alpha$	Oxiesteroles	
	NR1H2	LXR $\beta$		
	NR1H4	FXR $\gamma$		
I	NR1I1	VDR	Vitamina D Xenobióticos Androstano	
	NR1I2	PXR		
	NR1I3	CAR		
II	A	NR2A1	HNf4 $\alpha$	Ácidos grasos
		NR2A2	HNf4 $\gamma$	
	B	NR2B1	RXR $\alpha$	Retinoides
		NR2B2	RXR $\beta$	
		NR2B3	RXR $\gamma$	
	C	NR2C1	TR2	<i>(No identificado)</i>
		NR2C2	TR4	
E	NR2E1	TLX	<i>(No identificado)</i>	
	NR2E3	PNR		
F	NR2F1	COUP-TFI	<i>(No identificado)</i>	
	NR2F2	COUP-TFII		
	NR2F6	EAR-2		
III	A	NR3A1	ER $\alpha$	Estrógenos
		NR3A2	ER $\beta$	
	B	NR3B1	ERR $\alpha$	Dietilestilbestrol
		NR3B2	ERR $\beta$	
		NR3B3	ERR $\gamma$	
	C	NR3C1	GR	Cortisol
		NR3C2	MR	Aldosterona
NR3C3		PR	Progesterona	
NR3C4		AR	Testosterona	
IV	A	NR4A1	Nur77	<i>(No identificado)</i>
		NR4A2	NURR1	
		NR4A3	NOR-1	
V	A	NR5A1	SF1	Fosfolípidos
		NR5A2	LRH-1	<i>(No identificado)</i>
VI	A	NR6A1	GCNF	<i>(No identificado)</i>

## 2.2. Estructura

Los receptores nucleares comparten una organización estructural común, determinada por cinco regiones funcionales diferentes: la región A/B o dominio de transactivación, el dominio de unión al ADN o región C, la región D o “bisagra”, el dominio de unión a ligando o región E, y la región F<sup>61</sup> (Fig. 14). A pesar de esta estructura común, existen diferencias en estas regiones que, aunque no afectan la función primaria del receptor, definen su especificidad.



**Figura 14. Representación esquemática de la estructura general de los receptores nucleares.** A/B, C, D, E y F: regiones funcionales. Se representan además: las regiones de transactivación AF1 y AF2, y los “dedos de zinc” (Zn) en la región C. NH<sub>2</sub>- y -COOH: extremos N- y C-terminal, respectivamente. Adaptado de *Christopher & Sumito (2006)*.<sup>284</sup>

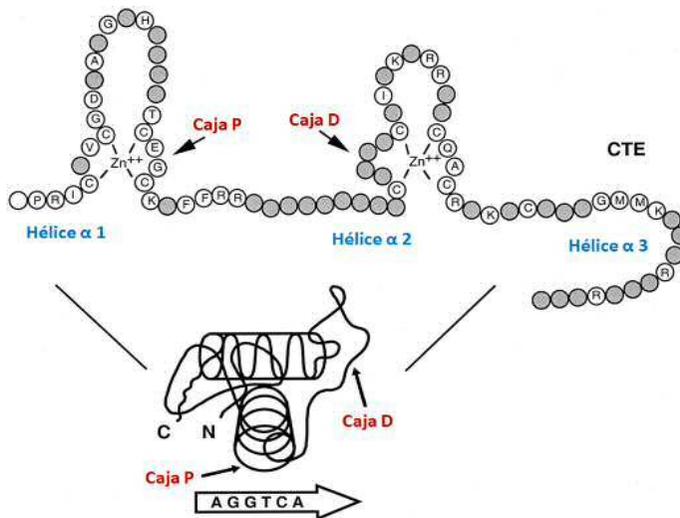
**Región A/B:** Situada hacia el extremo N-terminal, es la región más variable en tamaño (desde menos de 50 hasta más de 500 aminoácidos) y secuencia de los distintos receptores. Constituye el dominio de transactivación AF-1 (*Activation Function 1*), cuya acción es independiente de la unión del ligando,<sup>66</sup> en algunos casos se puede fosforilar para modular la actividad del receptor, y puede interactuar con co-factores y otros factores de transcripción. El *splicing* alternativo de esta región genera isoformas del receptor específicas según el tipo celular.

**Región C:** Constituye el dominio de unión al ADN (DBD, *DNA Binding Domain*) y es la región más conservada entre los diferentes receptores nucleares. Como su nombre lo indica, su función principal consiste en el reconocimiento y la unión del receptor a secuencias específicas presentes en la zona reguladora del gen diana, denominados elementos de respuesta. El DBD está formado por dos “dedos de zinc” de entre 60 y 70 aminoácidos, y

## INTRODUCCIÓN

una extensión C-terminal (CTE, *C-terminal Extension*) de unos 25 aminoácidos.

Los “dedos de zinc” tienen una estructura muy conservada (Cys-X<sub>2</sub>-Cys-X<sub>13</sub>-Cys-X<sub>2</sub>-Cys y Cys-X<sub>5</sub>-Cys-X<sub>9</sub>-Cys-X<sub>2</sub>-Cys), donde las cuatro cisteínas (Cys) de cada uno coordinan un ion Zn<sup>2+</sup>. Estudios cristalográficos de la estructura tridimensional del DBD han permitido identificar las zonas específicas responsables de la unión al ADN (Fig. 15). La zona C-terminal del primer “dedo de zinc” (denominada “caja P”) forma una hélice α responsable del reconocimiento de la mayor parte de la secuencia de unión. La “caja D” (formada por aminoácidos del segundo “dedo”) forma otra hélice α y tiene la función de estabilizar la unión al ADN mediante contactos específicos con las bases nitrogenadas, además de permitir la dimerización con otros receptores nucleares. Por último, una tercera hélice α (formada por la CTE y denominada “caja A”) está implicada en el reconocimiento del extremo 5' del elemento de respuesta y aumenta la especificidad de reconocimiento de cada isoforma.

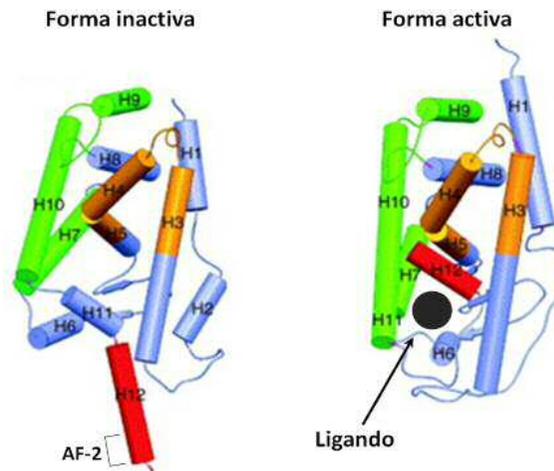


**Figura 15. Representación esquemática del DBD de los receptores nucleares.** Se indican las “cajas” P y D, los “dedos de zinc” y las tres hélices α responsables de la interacción del receptor con el elemento de respuesta en el ADN (AGGTCA en este caso). C y N: extremos C- y N-terminal del receptor, respectivamente. CTE: extensión C-terminal. Adaptado de *Aranda & Pascual (2001)*.<sup>61</sup>

**Región D:** Es una región de tamaño variable y poco conservada entre los diferentes receptores nucleares. Constituye una zona de unión flexible, que permite cambios conformacionales entre el DBD y la región E, por lo que también se denomina región “bisagra”. Esa plasticidad espacial confiere al DBD la posibilidad de girar sobre sí mismo para favorecer la interacción con el elemento de respuesta en la zona reguladora del gen diana, tanto en configuración “directa” como en configuración “invertida”. Además de su función estructural, la región “bisagra” se caracteriza por poseer señales de localización nuclear (NSL, *Nuclear Localization Signal*) y permite la interacción del receptor nuclear con co-represores.<sup>67,68</sup>

**Región E:** Constituye el dominio de unión al ligando (LBD, *Ligand Binding Domain*) y es la región más larga del receptor. Es un dominio funcional moderadamente conservado que, además de permitir la unión al ligando, media la homo- y heterodimerización entre receptores, la interacción con proteínas de choque térmico, la actividad transcripcional dependiente de ligando, y, en ciertos casos, la represión reversible de la transcripción.<sup>61</sup>

A pesar de que existen diferencias en la secuencia del LBD entre receptores, a nivel estructural este dominio está altamente conservado.<sup>69</sup> La estructura común consiste en 12 hélices  $\alpha$  dispuestas en tres capas antiparalelas,<sup>70</sup> aunque hay receptores que presentan diferencias.<sup>69</sup> La interacción con el ligando tiene lugar en una cavidad hidrofóbica compacta denominada “bolsillo de unión al ligando”, formada por el plegamiento de dichas capas de hélices  $\alpha$ . El tamaño de este “bolsillo” varía entre receptores, lo que permite la unión de ligandos de diferentes tamaños.<sup>71</sup> En la mayoría de los casos, la interacción del ligando provoca un cambio conformacional (Fig. 16) que hace que la región conservada AF-2 (*Activation Function 2*) presente hacia el extremo C-terminal del dominio, permita la unión de co-activadores y la consecuente activación del receptor.



**Figura I6. Representación de la estructura del LBD de los receptores nucleares.** Izquierda: conformación inactiva del dominio. Derecha: conformación activa tras la unión del ligando. Se indican las 12 hélices  $\alpha$  (H1-H12) y la región AF-2. Adaptado de Bourguet, Germain & Groenemeyer (2000).<sup>70</sup>

**Región F:** Presente sólo en algunos receptores nucleares, esta región muestra gran variabilidad. Aunque se conoce poco en cuanto a su estructura y función, se ha sugerido un posible papel de regulador negativo de la transcripción, al inhibir la capacidad de transactivación del receptor nuclear.<sup>72</sup>

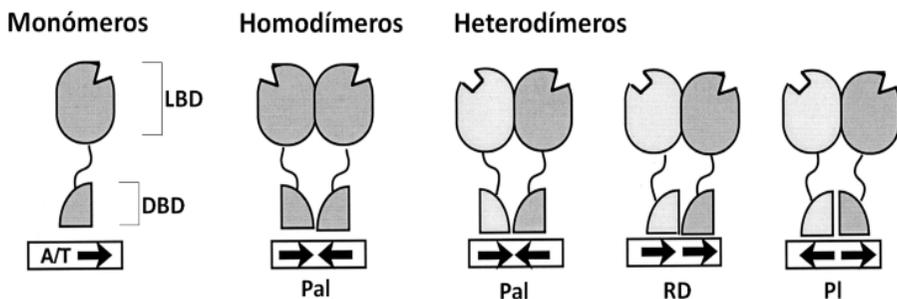
### 2.3. Mecanismos de acción

#### 2.3.1. Unión al ADN

Los receptores nucleares son factores de transcripción y, como tales, regulan la expresión génica mediante el reconocimiento y unión a secuencias de ADN específicas, presentes en la(s) zona(s) reguladora(s) de los genes diana. Dichas secuencias son conocidas como elementos de respuesta a hormonas (HRE, *Hormone Response Element*). En la mayoría de los casos, los HRE se localizan en la región promotora del gen diana, aunque también pueden encontrarse en otras regiones reguladoras alejadas del sitio de inicio de la transcripción. El análisis de un gran número de estos HRE reveló que el

núcleo de estas secuencias lo constituyen seis pares de bases, y se han propuesto dos secuencias consenso: 5'-AGAACA-3' y 5'-AGGTCA-3'. La primera de ellas es reconocida preferentemente por los receptores nucleares de la familia III excepto el receptor de estrógeno (ER), mientras que la segunda secuencia consenso es reconocida por el resto de los receptores, incluido el ER. Igualmente, ha de destacarse que hay HRE que pueden presentar modificaciones respecto a ambas secuencias consenso.

La gran mayoría de HRE están formados por dos secuencias hexaméricas, separadas por no más de cinco pares de bases, y organizadas como palíndromos, palíndromos invertidos o en repeticiones directas (Fig. 17). Estas disposiciones estructurales permiten la unión de los receptores nucleares en forma de dímeros (tanto homodímeros como heterodímeros). Sin embargo, algunos receptores nucleares “huérfanos” son capaces de unirse con afinidad como monómeros a una sola secuencia hexamérica, en cuyo caso, ésta última suele estar precedida por una zona rica en A/T.<sup>61</sup>



**Figura 17. Representación de la unión de los receptores nucleares a los HRE.** En forma de monómeros requieren de una zona rica en A/T que precede al HRE (flecha), mientras que como dímeros (homo- y heterodímeros) reconocen secuencias palindrómicas (Pal), repeticiones directas (RD) o palíndromos invertidos (PI). LBD: dominio de unión a ligando; DBD: dominio de unión a ADN. Adaptado de Aranda & Pascual (2001).<sup>61</sup>

La unión de los receptores nucleares al ADN no siempre resulta en la activación de la transcripción, sino que puede reprimir la transcripción del gen diana. Se han identificado elementos específicos presentes en la zona reguladora de varios genes, llamados elementos de respuesta negativos,

cuya secuencia es muy distinta a los elementos activadores clásicos. Los elementos de respuesta negativos permiten la unión del receptor nuclear, incluso activado por su ligando, e inhiben la transcripción del gen en cuestión. Los dos elementos de este tipo más estudiados son el nGRE y el nTRE. El elemento nGRE está presente en el promotor de los genes que codifican para la pro-opiomelanocortina (POMC), la IL-1 $\beta$ , la prolactina<sup>73</sup> y la hormona liberadora de gonadotropina,<sup>74</sup> mientras que el elemento nTRE se encuentra en el promotor del gen que codifica para la tirotropina o TSH.<sup>75</sup>

Los mecanismos a través de los cuales tiene lugar esta inhibición no son bien conocidos. Algunos casos podrían explicarse por un solapamiento del elemento de respuesta negativo con el elemento activador de otro factor, dando lugar a una competición que causa la inhibición de la transcripción.<sup>76</sup> También se ha postulado que la unión de un factor de transcripción a un elemento de respuesta negativo provoca un cambio conformacional que impide la transactivación.<sup>77</sup> A pesar de la existencia de estos elementos de respuesta negativos, la mayor parte del potencial inhibitorio de los receptores nucleares opera a través de otros mecanismos.

### 2.3.2. Interacción con la maquinaria transcripcional

La transcripción es un proceso complejo que necesita la participación de múltiples factores de forma conjunta y organizada. Cuando un receptor nuclear se une a su elemento HRE del gen diana, interactúa con factores de transcripción basales y otras proteínas para formar un complejo que estabiliza la unión al ADN y promueve la formación del complejo de iniciación de la transcripción. Una vez formado el complejo y correctamente posicionado en el promotor, la enzima ARN polimerasa II es reclutada al sitio de inicio de la transcripción, así como también los factores de transcripción basales TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF, y TFIIH. El TFIID está formado por la TBP y al menos ocho factores asociados (TAF, *Tightly Associated Factors*).<sup>78</sup> La activación de la transcripción por parte de los receptores nucleares, puede estar mediada por la interacción de éstos últimos con la TBP y con factores TAF del TFIID.<sup>79</sup>

### 2.3.3. Interacción con co-reguladores

Una vez unidos a su HRE, los receptores nucleares pueden reclutar un número significativo de moléculas adicionales (co-reguladores) o co-reguladores transcripcionales. Estas moléculas, en su mayoría de naturaleza proteica, pueden clasificarse en co-activadores o co-represores, dependiendo si facilitan o inhiben la transcripción, respectivamente.<sup>61,80</sup> Las funciones de estas proteínas son variadas e incluyen mecanismos que implican la remodelación de la cromatina (permitiendo una mayor o menor accesibilidad de la maquinaria transcripcional a los genes diana) o la estabilización de la unión de otros co-reguladores. La descripción de un gran número de estas moléculas ha permitido explicar la gran diversidad de funciones biológicas ejercidas por los receptores nucleares en condiciones específicas.

**Co-activadores:** Actúan sobre la actividad enzimática necesaria para descondensar la cromatina, desplegar el ADN y reclutar la ARN polimerasa II, lo que suscita el inicio de la transcripción del gen diana.<sup>81</sup> La interacción de los co-represores con los receptores nucleares tiene lugar a través de las regiones AF-1 y AF-2 de éstos últimos. La unión al dominio AF-1 puede ocurrir de forma independiente de la unión del ligando, en cuyo caso está regulada por modificaciones como la fosforilación del receptor. La interacción con la región AF-2 tiene lugar tras el cambio conformacional del LBD, producido por la unión del ligando.

Se han descrito diferentes familias de co-activadores con actividad acetil transferasa (HAT, *histone acetyltransferase*), que facilita la interacción entre el ADN y el complejo de iniciación de la transcripción.<sup>82</sup> Una de las más conocidas es la familia p160/SRC, formada por las proteínas SRC-1, TIF2 y TRAM-1.<sup>83</sup> Otra familia de co-activadores con actividad HAT es la integrada por p300 y CBP.<sup>84</sup> Estas proteínas favorecen además el reclutamiento de la maquinaria de transcripción al interactuar con otros co-activadores como el co-activador 1 de PPAR $\gamma$ .<sup>85</sup> Otra de las familias descritas agrupa proteínas capaces de establecer la unión directa entre los receptores nucleares y los

factores de transcripción basales. A este grupo pertenece el complejo TRAP/DRIP/ARC.<sup>86,87</sup>

Otros co-activadores presentan actividades enzimáticas muy variadas como actividad ubiquitina ligasa, ATPasa y metilasa.<sup>88-90</sup> También se ha identificado un co-activador de naturaleza oxirribonucleica, el SR-A, que interactúa con el dominio AF-1 del receptor de esteroides mediante la formación de un complejo nucleorriboproteico.<sup>91</sup>

**Co-represores:** La asociación de estas moléculas con los receptores nucleares ejerce una acción represora sobre la transcripción, generalmente en ausencia de ligando. Los co-represores forman complejos multiproteicos con actividad histona deacetilasa, que elimina los grupos acetilo de las histonas nucleosomales. Esta acción provoca la condensación de la cromatina e impide la unión de las moléculas necesarias para la transcripción, con lo cual se produce el silenciamiento génico. Entre los co-represores más conocidos destacan NCoR y RIP-140.<sup>67,68,92</sup>

En algunos casos, la acción del co-represor es dependiente de ligando y tiene lugar porque provoca la competición con moléculas co-activadoras por la unión con el receptor.<sup>93</sup>

### **2.3.4. Interacción con otras vías de señalización**

Los receptores nucleares constituyen dianas de diferentes vías de señalización, pueden interferir a la vez con otras vías y modular (generalmente de forma negativa) la expresión de un gen determinado. La interferencia de los receptores nucleares con otros factores de transcripción puede ocurrir a través de diferentes mecanismos como la unión del receptor al ADN o por interacción proteína-proteína.

#### ***Interferencia mediante la unión al ADN***

Este proceso tiene lugar cuando se establece una competición entre receptores nucleares y otros factores de transcripción por la unión a una zona del ADN, donde se encuentran sus elementos de respuesta

correspondientes muy cercanos entre sí. Tal es el caso de AP-1, que compite con el receptor de glucocorticoides en el promotor del gen de la proliferina<sup>94</sup> y con el receptor del ácido retinoico en el promotor del gen de la osteocalcina.<sup>95</sup> En ambos casos el sitio de unión al ADN está formado por un elemento mixto (HRE-AP-1), al que se pueden unir tanto el receptor nuclear como AP-1. La actividad de AP-1 también puede ser modulada por el receptor de estrógenos (ER, *Estrogen Receptor*), aunque en este caso la regulación es más compleja. El resultado de esta competición puede ser un aumento o una inhibición de la actividad del factor de transcripción, en función de la isoforma de ER (ER $\alpha$  o ER $\beta$ ), del inductor fisiológico, de la composición de AP-1 (heterodímero c-Fos/c-Jun u homodímero c-Jun/c-Jun) o del tipo celular.<sup>96,97</sup>

### ***Interacción proteína-proteína***

Cuando la interacción entre un receptor nuclear y otro factor de transcripción provoca la inhibición de la actividad de una o ambas proteínas, tiene lugar un mecanismo de trans-represión. Este mecanismo ocurre de forma independiente de ligando y de la unión al ADN, y parece jugar un papel importante en los efectos anti-inflamatorios y anti-proliferativos de los receptores nucleares, al afectar la regulación de genes involucrados en estos procesos. Dos de los factores de transcripción implicados en este tipo de regulación son NF- $\kappa$ B y AP-1.

NF- $\kappa$ B presenta un antagonismo recíproco con el receptor de glucocorticoides (GR, *Glucocorticoid Receptor*), ya que cada uno inhibe la actividad transcripcional del otro. La hipótesis más aceptada que explica este antagonismo es que GR y NF- $\kappa$ B compiten por un co-activador común, como SRC-1.<sup>98</sup> Otra posible explicación es la interacción directa entre GR y NF- $\kappa$ B, que bloquea la activación del factor de transcripción e impide su unión con el ADN.<sup>99</sup> En este contexto, también se ha propuesto que GR induce la síntesis de I $\kappa$ B $\alpha$ , un inhibidor que se une a NF- $\kappa$ B en el citoplasma e impide la traslocación del factor de transcripción al núcleo,<sup>100</sup> o inhibe la degradación de dicho inhibidor.<sup>101</sup> Además de GR, sobre NF- $\kappa$ B ejercen efectos similares otros receptores nucleares como ER,<sup>102</sup> el receptor de andrógenos<sup>103</sup> y

algunos receptores “huérfanos”, como los de la familia NR4A.<sup>104–106</sup> Con relación a AP-1, la actividad de este factor de transcripción puede ser inhibida por GR mediante la interacción directa con el DBD del receptor nuclear.<sup>107–109</sup> Este tipo de interacción se ha observado también con ER,<sup>110</sup> el receptor del ácido retinoico (RAR, *retinoic acid receptor*),<sup>111</sup> y el receptor de la hormona tiroidea (TR, *thyroid hormone receptor*).<sup>112</sup>

Aunque por lo general la interacción entre receptores nucleares y otros factores de transcripción tiene efectos inhibitorios, en ocasiones da lugar a un sinergismo funcional. Dicha interacción puede determinar la especificidad de una respuesta hormonal concreta, restringida sólo a células que expresen un determinado conjunto de factores de transcripción. Este sinergismo se manifiesta en la regulación de los genes que codifican para la prolactina y la hormona de crecimiento en la pituitaria, que requieren la interacción entre el factor de transcripción GHF-1 y RAR, TR y el receptor de la vitamina D.<sup>113,114</sup> También se ha observado un efecto sinérgico en la interacción entre los receptores GR y PR con el factor de transcripción Oct-1, en la inducción del promotor del virus tumoral mamario en ratones.<sup>115</sup>

### 2.4. La familia NR4A

La familia NR4A está compuesta por los receptores “huérfanos” NR4A1 (Nur77, TR3, NGFI-B, DHR38), NR4A2 (Nurr1, NOT) y NR4A3 (NOR-1, TEC, MINOR, CHN). El primer miembro de esta familia en clonarse fue Nur77, identificado en fibroblastos estimulados con agentes mitogénicos<sup>116</sup> y en neuronas estimuladas con NGF.<sup>117</sup> Años después se identificó a Nurr1 (*Nur77-Related factor 1*, por su homología con Nur77), inicialmente caracterizado en neuronas dopaminérgicas como un factor de transcripción específico de cerebro.<sup>118</sup> Posteriormente, se describió a NOR-1 (*Neuron-derived nuclear Orphan Receptor-1*) como el tercer miembro de esta familia, identificado por primera vez en neuronas en cultivo y en linfocitos T activados.<sup>119,120</sup>

Los tres miembros de esta familia presentan la estructura típica de los receptores nucleares, con elevada homología en el DBD (el 94% de los residuos son idénticos), homología moderada en el LBD, y poca homología en el dominio N-terminal. Se expresan en tejidos con alta actividad metabólica como el músculo esquelético, el tejido adiposo, el corazón, el riñón, las células T, el hígado y el cerebro,<sup>121</sup> y se caracterizan por una rápida expresión como respuesta a un amplio rango de estímulos, por lo que son clasificados como “genes de respuesta temprana”. La activación de estos factores de transcripción tiene lugar de forma independiente de ligando y se produce básicamente por el incremento de la expresión del receptor, aunque también por modificaciones post-traduccionales como la fosforilación (en el caso de Nur77)<sup>122</sup> o la sumoilación (en el caso de Nurr1).<sup>123</sup>

Entre los estímulos capaces de inducir la expresión de NOR-1, Nurr1 y Nur77 se encuentran desde hormonas, neurotransmisores, factores de crecimiento, citoquinas pro-inflamatorias y lipoproteínas,<sup>124-126</sup> hasta factores físicos como el flujo sanguíneo y despolarizaciones de la membrana plasmática.<sup>127-129</sup> La respuesta a esta gran variedad de estímulos y la amplia distribución de estos receptores en diferentes tejidos y tipos celulares, sitúan a NOR-1, Nurr1 y Nur77 en múltiples procesos biológicos, de los cuales una buena parte no ha sido descrita. Se han implicado en el desarrollo embrionario, el desarrollo de las neuronas dopaminérgicas, la memoria, y participan en procesos celulares como la apoptosis, la proliferación, la supervivencia, la inflamación y la diferenciación celular.<sup>121,125,130-133</sup> Por todo ello, numerosos estudios realizados en los últimos años evidencian la relación de los NR4A con enfermedades de gran prevalencia a nivel mundial como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares, la enfermedad de Parkinson, la diabetes y la obesidad,<sup>134-142</sup> convirtiéndose en un foco de atención en la lucha contra estas patologías.

### 2.4.1. Unión al ADN

Una de las características de los NR4A que los diferencia de otros receptores nucleares es su capacidad de unirse al ADN tanto en forma de monómeros como de dímeros. En forma de monómeros, los NR4A se unen a una secuencia específica conocida como NBRE (*NGFI-B response element*), constituida por una de las secuencias hexaméricas consenso típicas de los receptores nucleares (epígrafe 2.3.1) precedida de dos adeninas (5'-AAAGGTCA-3').<sup>143</sup> En forma de homodímeros, los NR4A reconocen al elemento NuRE (*Nur-Responsive Element*), formado por dos octámeros invertidos semejantes al elemento NBRE (5'-AAAT(G/A)(C/T)CA-3') y separados por un número limitado de nucleótidos. La secuencia NuRE de referencia se encuentra en el promotor del gen POMC.<sup>144</sup> NOR-1 presenta menor afinidad por este tipo de elemento, lo que se traduce en una activación débil de la transcripción.<sup>145</sup> Nurr1 y Nur77 pueden también formar heterodímeros con los receptores X retinoides y unirse al elemento DR5, compuesto por dos secuencias hexaméricas consenso típicas de los receptores nucleares separadas por cinco nucleótidos.<sup>146</sup>

#### Monómeros

**NBRE**    **AAAGGTCA**

#### Homodímeros/Heterodímeros de NR4A

**NurRE**     $\overleftarrow{\text{TGATATTTACCTCCAAATGCCA}}\overrightarrow{\hspace{1cm}}$   
(POMC)

#### Heterodímeros con RXR

**DR5**     $\overrightarrow{\text{GGTTCACCGAAAGGTCA}}\overleftarrow{\hspace{1cm}}$

---

**Figura 18. Elementos de respuesta de la familia de receptores NR4A.** Se muestra la secuencia de los elementos NBRE (al cual se unen en como monómeros), NuRE (al cual se unen formando homo- y heterodímeros entre sí) y DR5 (al cual se unen formando heterodímeros con RXR). La secuencia NuRE corresponde a la del promotor POMC. Adaptado de *Maxwell & Muscat (2006)*.<sup>121</sup>

#### 2.4.2. Estructura génica y proteica de NOR-1

La estructura génica de los tres miembros de la familia NR4A es muy similar, lo que sugiere que estos receptores han evolucionado a partir de un ancestro común. En humanos, el gen que codifica para NOR-1 se localiza en el cromosoma 9 y está constituido por 8 exones, con una estructura exones-intrones similar a la de otros receptores nucleares.<sup>147</sup> Se ha propuesto la existencia de cuatro isoformas diferentes de NOR-1, como resultado de procesos de *splicing* alternativo que involucran los exones 3 y 5.<sup>148,149</sup> Las diferencias a nivel del exón 3 pueden dar lugar a dos transcritos (NOR-1 $\alpha$  y NOR-1 $\beta$ ), sin afectar el proceso posterior de traducción. Por el contrario, la variación del *splicing* a nivel del exón 5 produce la aparición de un codón de parada en los dos transcritos resultantes (NOR-1 $\alpha'$  y NOR-1 $\beta'$ ), que darían lugar a proteínas truncadas desprovistas de la región C-terminal correspondiente al LBD. De manera similar a lo que sucede con una variante de Nurr1 carente del LBD,<sup>150</sup> la forma truncada resultante de NOR-1 actuaría como dominante negativo.

Aunque NOR-1 y los demás miembros de la familia NR4A presentan la estructura típica de los receptores nucleares, muestran algunas peculiaridades. Las diferencias más notables se observan en el LBD puesto que la región AP-2 parece no participar en el reclutamiento de moléculas co-reguladoras.<sup>151,152</sup> De esta manera, la activación por co-factores se produce a través del dominio AF-1, situado en el extremo N-terminal del receptor. Este dominio puede reclutar otros co-activadores como CBP, elementos del complejo TRIP/TRAF y las proteínas de la familia p160. La interacción de AF-1 con éstas últimas puede también promover una unión intramolecular con el LBD, posiblemente para estabilizar el complejo receptor/co-activadores. Cambios en la topología del LBD pudieran explicar las diferencias observadas. Estudios de modelado molecular de NOR-1<sup>151</sup> y el análisis por cristalografía de su ortólogo en *Drosophila* (GHR38),<sup>153</sup> indican que la topología del LBD no permite la correcta interacción con co-factores debido a la peculiaridad estructural de la región AF-2. A diferencia de la mayoría de los receptores nucleares, que en este dominio presentan un surco hidrofóbico necesario para la interacción con los co-factores, en los NR4A

existen residuos hidrofílicos que rompen la continuidad del surco e impiden la unión de dichas moléculas.

La particularidad estructural del LBD de los NR4A no sólo permite explicar la baja eficiencia para unir co-factores, sino también la incapacidad de unión de un ligando. Estudios cristalográficos indican que GHR38 presenta el “bolsillo de unión al ligando” un tanto peculiar, ocupado por cadenas laterales de cuatro fenilalaninas que dejan un espacio de tan sólo 30 Å<sup>3</sup>, insuficiente para permitir la unión de una molécula orgánica. Estos residuos hidrofóbicos están conservados en Nurr1<sup>154</sup> y Nur77, por lo que la incapacidad de unir un ligando se extiende a toda la familia. Además, un residuo de arginina conservado en la mayoría de los receptores nucleares cuya función es ayudar al anclaje del ligando, en la familia NR4A está orientado hacia el solvente. Todos estos datos sugieren que ni Nurr1 ni GHR38 tienen ligando, al menos ninguno que siga el modelo estándar de los receptores nucleares. La elevada similitud estructural del “bolsillo hidrofóbico” de Nurr1, GHR38 y NOR-1, y la peculiaridad estructural de la región AP-2 de éste último, confirman la incapacidad de unión a ligando de NOR-1.

A pesar de ello, un estudio más reciente ha identificado a la citosporona B (Csn-B) como una molécula capaz de unirse con gran afinidad al LBD de Nur77 e inducir la actividad transcripcional del receptor.<sup>155</sup> La Csn-B sería el primer agonista/ligando encontrado para un miembro de la familia NR4A. Por otro lado, otros estudios sugieren la posibilidad de que determinados ácidos grasos también puedan interactuar con el LBD de Nur77<sup>156</sup> y, a pesar de que el LBD de estos receptores dificulta la interacción con co-factores, estudios de resonancia magnética nuclear y cristalografía han identificado una región hidrofóbica del LBD de Nurr1, que permitiría esta interacción.<sup>157</sup>

### 2.4.3. Papel de NOR-1 en la biología vascular

La implicación de la familia NR4A en la biología vascular empezó a ponerse de manifiesto gracias al uso de técnicas como el *Differential Display* y los

*microarrays*, que permiten la identificación de genes expresados diferencialmente.<sup>158</sup> De hecho, los tres receptores NR4A son fuertemente activados por estímulos pro-aterogénicos en CMLV, CE y macrófagos,<sup>125</sup> sin embargo, el papel fisiológico ejercido por estos receptores nucleares resulta a veces contradictorio.

Diversos estudios afirman la importancia de NOR-1 y los demás miembros de esta familia en el control de la expresión génica a nivel vascular, con un papel crítico en procesos como el remodelado vascular, la viabilidad celular, la proliferación y la inflamación. Estas evidencias convierten a NOR-1 en una diana terapéutica potencial, en cuyo estudio muchos grupos de investigación (incluido el nuestro) han centrado su atención.

### ***NOR-1 y la proliferación***

La proliferación celular es un proceso crítico en muchas patologías. La proliferación de las CMLV es esencial en el remodelado vascular, responsable de la formación de la cubierta fibrosa en la enfermedad aterosclerótica, y en el proceso de restenosis coronaria post-angioplastia. La proliferación de las CE, por su parte, es clave en procesos como la reparación del endotelio y la formación de nuevos vasos sanguíneos. Tanto NOR-1 como Nurr1 y Nur77, se han visto implicados en estos eventos, aunque existen resultados que les han atribuido funciones tanto pro- como anti-proliferativas.

Los resultados obtenidos por nuestro grupo en el estudio de NOR-1 sugieren que este receptor nuclear tiene un papel pro-proliferativo. En este sentido, demostramos por primera vez que el bloqueo de la expresión de NOR-1 mediante oligonucleótidos antisentido o con ARN de interferencia (siRNA, *small interference RNA*), disminuye la proliferación celular inducida por factores mitogénicos como el suero y las LDL en CMLV,<sup>159,160</sup> o como el VEGF y la trombina en CE.<sup>161,162</sup> En ambos tipos celulares, el silenciamiento de NOR-1 provoca una disminución drástica de la síntesis de ADN y una alteración de la progresión del ciclo celular, reflejada en la acumulación de células en fase G0/G1, y previene la proliferación y la migración celular.

Diferentes estudios han descrito un aumento rápido de la expresión del gen de NOR-1 en respuesta al factor de crecimiento PDGF-BB, y refuerzan el papel pro-proliferativo de este receptor en CMLV.<sup>160,163-166</sup> De igual forma, la expresión de NOR-1 aumenta rápidamente en las CMLV de aorta sometida a una lesión intravascular en el modelo porcino.<sup>160</sup> Estudios realizados en un modelo de ratón transgénico (que sobre-expresa NOR-1 en CML) desarrollado por nuestro grupo, mostraron un aumento de la formación de neoíntima inducida por la ligadura de la arteria carótida, así como un incremento de la actividad mitogénica en CMLV procedentes de estos animales.<sup>167</sup> Nuestros resultados están acorde a los obtenidos por otros investigadores en un modelo de ratón deficiente de NOR-1, quienes observaron una disminución de la formación de neoíntima después de provocar un daño vascular *in vivo*, así como un descenso en la proliferación y una alteración del ciclo celular de las CMLV de estos animales.<sup>168</sup>

En contraposición con estos datos, la sobre-expresión de un dominante negativo que suprime la actividad de los receptores NR4A en un modelo de ratón transgénico, aumenta la formación de neoíntima inducida por la ligadura de la arteria carótida *in vivo*, e incrementa la actividad mitogénica de las CMLV *in vitro*.<sup>129</sup> Cabe destacar que, en este modelo, el bloqueo funcional se realiza a nivel de los tres receptores nucleares, por lo que la actividad paradójica resultante puede estar relacionada con la función de los otros dos miembros de la familia NR4A. Aunque diferentes resultados indican una función pro-proliferativa de Nur77,<sup>169-171</sup> otros estudios atribuyen tanto a este receptor como a Nurr1 un efecto anti-proliferativo en células vasculares *in vitro* e *in vivo*.<sup>129,172-178</sup>

La activación de NOR-1 en respuesta a diferentes estímulos mitogénicos parece estar relacionada con la presencia de tres elementos de respuesta al factor de transcripción CREB en su promotor.<sup>161-163,179</sup> Aunque el conjunto de resultados indican que CREB es probablemente el responsable de la proliferación de las células vasculares a través de la activación de NOR-1, otros resultados (al margen de NOR-1) otorgan a CREB funciones anti-proliferativas. Estos hechos demuestran la complejidad de un sistema en el

cual el balance entre la actividad proliferativa y la quiescencia de la célula, depende tanto del estímulo recibido como del tipo celular.

Un aspecto que parece determinante para entender los mecanismos por los cuales NOR-1 y los demás NR4A regulan la proliferación, es la capacidad de estos receptores de modular la expresión de proteínas implicadas en el ciclo celular. NOR-1 se ha asociado con la inducción de la expresión de proteínas activadoras como las ciclinas D1 y D2.<sup>163,168</sup> Resultados similares se han obtenido para Nur77, que modula la expresión de la ciclina A y la ciclina D1.<sup>170</sup> Por otro lado, se ha descrito que NOR-1 induce la expresión de Skp2 en CMLV a través de un elemento NBRE, lo que resulta en la degradación de la proteína p27 inhibidora del ciclo celular, y un aumento de la proliferación.<sup>166</sup>

### ***NOR-1 y el balance supervivencia celular / apoptosis***

En la aterosclerosis, diferentes factores pro-aterogénicos presentes en las lesiones como las oxLDL y citoquinas pro-inflamatorias como el TNF $\alpha$ , son capaces de inducir apoptosis. Las principales células afectadas son las CMLV, los macrófagos y las CE, aunque la muerte prematura de cada uno de estos tipos celulares tiene consecuencias distintas.

La apoptosis de las CMLV se ha relacionado con una disminución de la estabilidad de la placa aterosclerótica, que pudiera provocar su ruptura.<sup>38</sup> En el caso de las CE, se ha observado la apoptosis de estas células durante toda la evolución de la enfermedad y se ha relacionado con una mayor inestabilidad de la placa. Por su lado, la repercusión de la apoptosis de los macrófagos en la lesión aterosclerótica depende del estadio de desarrollo de la lesión: en fases tempranas la muerte de este tipo celular favorece el desarrollo de las lesiones,<sup>180</sup> mientras que parece contribuir a la vulnerabilidad de la placa en estados más avanzados.<sup>181,182</sup>

A nivel vascular, pocos estudios abordan el papel de NOR-1 en el proceso apoptótico. En este contexto, nuestro grupo ha descrito a este receptor nuclear como un factor implicado en la supervivencia de las CE sometidas a hipoxia.<sup>183</sup> En este caso, la sobre-expresión de NOR-1 previene la apoptosis

inducida por la deficiencia de oxígeno en estas células, mientras que la deficiencia del receptor conduce al resultado opuesto. Dicho efecto anti-apoptótico podría estar relacionado con la capacidad de NOR-1 de inducir la proteína inhibidora de la apoptosis cIAP2.

### ***NOR-1 y la inflamación***

En la cardiopatía isquémica el desarrollo de las placas ateroscleróticas está relacionado con un estado inflamatorio crónico.<sup>184</sup> En las últimas décadas numerosos estudios han relacionado a los receptores nucleares con la inflamación, en la mayoría de los casos, por su capacidad de inhibir la actividad de factores de transcripción como NF-κB, AP-1 o NFAT. Tres receptores nucleares (GR, ER y PPARα) son capaces de inhibir la actividad de NF-κB. Recientemente, también se ha relacionado a la familia NR4A con la inflamación, tanto en los macrófagos como en las CE y CMLV.

En macrófagos y monocitos, la expresión de NOR-1, como la de Nur1 y Nur77, se incrementa en respuesta a estímulos inflamatorios como el LPS, el TNFα o las oxLDL.<sup>126,133,185,186</sup> Los tres receptores se expresan en los macrófagos presentes en lesiones ateroscleróticas, especialmente en zonas activadas.<sup>133</sup> En estas células, la sobre-expresión de NOR-1 y los otros NR4A tiene varios efectos anti-inflamatorios: reduce la captación de oxLDL mediante la inhibición de la expresión de algunos receptores *scavengers* (como SR-A y CD36), y reduce la expresión de citoquinas pro-inflamatorias (como IL1β, IL6, IL8 y MCP-1) y de enzimas como la COX-2 en respuesta a LPS, TNFα y oxLDL.<sup>133,186</sup> Este efecto anti-inflamatorio también se ha observado *in vivo*, ya que macrófagos de ratones deficientes en Nur77 presentan una mayor producción de citoquinas inflamatorias y una mayor captación lipídica en ciertos casos, lo que se traduce en un aumento en el desarrollo de placa aterosclerótica.<sup>187,188</sup>

Un estudio reciente de nuestro grupo muestra a NOR-1 como un receptor nuclear con potencial anti-inflamatorio en CMLV humanas.<sup>106</sup> En estas células, la sobre-expresión de NOR-1 previno el incremento de la expresión de citoquinas inflamatorias (IL6, IL8, IL1β, CCL20 y MCP-1) inducido por LPS y

TNF $\alpha$ . El mismo efecto se observó en CMLV derivadas de un modelo de ratón transgénico que sobre-expresa la proteína NOR-1 humana, y en estudios *in vivo* realizados en este modelo animal. Se observó que la sobre-expresión de NOR-1 inhibe la actividad de NF- $\kappa$ B, ya que previene la translocación al núcleo de la subunidad p65 de este factor de transcripción como respuesta a LPS. Al parecer, este efecto podría estar relacionado con una atenuación de las vías de señalización MAPK, cJNK y p38-MAPK, que conducen a la activación de NF- $\kappa$ B. En esta línea, otros resultados han hecho referencia a la capacidad de Nurr1 de inhibir la expresión de TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$  y MCP-1 en CMLV, aunque se desconocen los mecanismos responsables.<sup>174</sup>

Contrariamente al papel de NOR-1 en CMLV, en CE este receptor parece tener efectos pro-inflamatorios. Su sobre-expresión en este tipo celular induce la expresión de los genes que codifican para las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1 a través de elementos de respuesta NBRE, mientras que su deficiencia reduce la adhesión de los monocitos *in vitro* e *in vivo*.<sup>189</sup> En esta línea, resultados recientes de nuestro grupo indican que, en CE, los micro-ARN miR-17 y miR-20a atenúan la expresión de NOR-1 inducida por VEGF, y consecuentemente se modularía la expresión de VCAM-1 mediada por este receptor.<sup>190</sup>

Cabe destacar que, en CE, el potencial anti-inflamatorio atribuido a la familia NR4A se centra básicamente en los efectos de Nur77, ya que la sobre-expresión de este receptor impide la activación de NF- $\kappa$ B y previene la activación endotelial en respuesta a IL1 $\beta$  y TNF $\alpha$ , lo que se traduce en la disminución de la adhesión de ICAM-1 y VCAM-1, y un reclutamiento reducido de monocitos.<sup>191,192</sup>

#### 2.4.4. Papel de NOR-1 en la biología del músculo esquelético

Muchos estudios relacionan a NOR-1 y los demás miembros de la familia NR4A con la regulación del metabolismo energético del músculo esquelético. En este contexto, la implicación de estos receptores en el control transcripcional de enzimas clave en el metabolismo lipídico y glucídico es muy reciente.

En células de músculo esquelético, la expresión de NOR-1 se induce por factores de crecimiento, estímulos  $\beta$ -adrenérgicos y el ejercicio.<sup>193-195</sup> En un modelo murino que sobre-expresa este receptor en el músculo esquelético, se ha observado un aumento de la expresión de GLUT4 y del consumo energético.<sup>196</sup> A su vez, la sobre-expresión de NOR-1 en este tipo celular está relacionada con un aumento del metabolismo de la glucosa *in vitro*.<sup>197</sup> En esta línea, otros estudios indican que el silenciamiento de NOR-1 en células de músculo esquelético provoca alteraciones del metabolismo, que se reflejan en la inhibición de genes que codifican para proteínas implicadas en la oxidación de los ácidos grasos y el uso de piruvato.<sup>198</sup>

Dado el papel de NOR-1 en el metabolismo lipídico y glucídico, se ha propuesto a este receptor como un nexo entre el rendimiento muscular y la capacidad metabólica,<sup>196,199</sup> aunque se han descrito relativamente pocos genes diana relacionados con estas funciones.

### 3. LAS PROTEÍNAS A2M Y SMPX

NOR-1 y los demás miembros de la familia NR4A se expresan en lesiones ateroscleróticas humanas,<sup>129,133,160,163,173,189</sup> y han sido implicados en la formación de neointima como respuesta al daño vascular.<sup>129,167,168</sup> En tal contexto, estos receptores juegan un papel importante en la modulación de procesos como la proliferación, la apoptosis, la supervivencia celular y la inflamación. No obstante, se desconocen la mayoría de genes regulados por estos receptores, a través de los cuales ejercen su acción. Uno de los temas que centran el interés de nuestro grupo de investigación es la identificación de nuevos genes regulados por NOR-1 y por los demás miembros de la familia NR4A.

En la búsqueda de genes diana de NOR-1, resultados preliminares de nuestro grupo procedentes de estudios de expresión génica diferencial (mediante *microarrays*), sugerían la regulación por NOR-1, Nurr1 y Nur77 del gen de la A2M (Anexo I), y del gen de la SMPX por parte de NOR-1 (Anexo II).

### 3.1. La alfa-2 macroglobulina

El gen A2M codifica para la alfa-2 macroglobulina (A2M), una de las anti-proteinasas más abundantes en el plasma de los vertebrados,<sup>200</sup> y cuya función principal consiste en inhibir un amplio rango de proteasas.<sup>201-203</sup> Esta glicoproteína es producida sobre todo por las células hepáticas, aunque también ha sido detectada en fibroblastos de diferentes orígenes<sup>204</sup> y en el endotelio de pequeños vasos.<sup>205</sup>

La A2M es una proteína tetramérica de gran tamaño, formada por cuatro sub-unidades idénticas de 180 kDa aproximadamente, unidas entre sí por puentes disulfuro e interacciones no covalentes.<sup>206</sup> Localizada hacia el centro de cada una de las subunidades se encuentra una secuencia de aminoácidos denominada *bait region*, que es susceptible a la escisión por parte de la mayoría de las endopeptidasas. El corte en esta región provoca un cambio conformacional en la estructura de la A2M y el consecuente atrapamiento de la peptidasa en cuestión.<sup>207,208</sup> Posterior a este cambio, se expone un fragmento de 138 aminoácidos localizado hacia el extremo C-terminal, que es reconocido por el receptor LRP/A2M-R, presente en diferentes tipos celulares. El complejo A2M/proteasa es entonces endocitado y degradado, con lo que se elimina la peptidasa de la circulación.<sup>200</sup>

Varios polimorfismos del gen de la A2M han sido asociados a la enfermedad de Alzheimer, aparentemente por la incapacidad de las proteínas resultantes en estos casos de degradar los depósitos  $\beta$ -amiloides.<sup>209-211</sup> En el contexto vascular, se han detectado cantidades sustanciales de A2M en lesiones ateroscleróticas,<sup>212-215</sup> hecho que sugiere un posible papel en la estabilización de la placa a través de la inhibición de las MMP.<sup>201,202,216</sup> Los “sustratos” de la A2M incluyen en general serín, cisteín y aspartil proteasas.<sup>201-203</sup> De esta forma, es capaz de inhibir proteinasas implicadas en la coagulación como la trombina y el factor Xa,<sup>217,218</sup> y enzimas fibrinolíticas como uPA, tPA y la plasmina.<sup>219-222</sup> Otros estudios han relacionado a la A2M con la supervivencia de las CMLV y destacan su papel crítico en los mecanismos anti-apoptóticos,<sup>223</sup> lo que resalta el interés de esta anti-proteinasas en la patología aterosclerótica.

Aunque la A2M se considera una proteína de fase aguda, hasta el momento pocos estímulos pro-inflamatorios, entre ellos la IL-6, parecen capaces de inducir la expresión del gen que la codifica.<sup>224,225</sup> Se ha sugerido que la regulación de su expresión está mediada por efectos sinérgicos entre receptores nucleares y otros factores de transcripción. De hecho, en células hepáticas se ha propuesto la interacción entre el GR y el factor STAT-3,<sup>225</sup> y en células de ovario de rata, entre el receptor COUP-TF y el factor STAT-5b.<sup>226</sup>

La capacidad de atrapar no solo proteasas, sino también otras moléculas, sitúa a la A2M en la modulación de procesos diversos como la inflamación y la defensa frente a patógenos. La A2M participa significativamente en la contención y regulación de la inflamación, al atrapar proteasas, defensinas y otros péptidos liberados por células inflamatorias y del sistema inmune.<sup>200</sup> También puede actuar como un transportador y modular la acción de citoquinas como la IL-6, la IL-1 $\beta$  y el TNF $\alpha$ , y de factores de crecimiento como el PDGF, el NGF y el bFGF.<sup>200,227,228</sup> Igualmente, puede unirse a hormonas como la hepcidina y la leptina<sup>229,230</sup>, e inhibir la producción de especies reactivas del oxígeno y la degradación del cartílago, al capturar enzimas como TRACP, ADAMTS-7 y ADAMTS-12, respectivamente.<sup>231,232</sup>

### 3.2. La SMPX

El gen de la SMPX (*Small Muscle Protein X-linked*) fue descrito por primera vez en 1999 y codifica a una proteína de 9 kDa que se expresa mayoritariamente en células de músculo esquelético y cardíaco de tejidos adultos.<sup>233,234</sup> Aunque la función fisiológica de esta proteína no es del todo conocida, se ha asociado a la formación de las cámaras del miocardio y a diferentes proteínas del citoesqueleto.<sup>234,235</sup>

En estado embrionario, la SMPX se expresa en el músculo esquelético en desarrollo y en las regiones correspondientes a las futuras cámaras del miocardio.<sup>235</sup> De hecho, en el corazón el gen de la SMPX se considera un gen “cámara-específico”, que se activa como parte del programa de expresión

génica específico de las cámaras del miocardio, junto Nppa, Cx40 y Cx43.<sup>234,236</sup> Curiosamente, la formación de las estructuras especializadas del corazón, como el nodo sinoatrial, requieren la supresión local de estos genes “cámara-específicos” incluido el gen de la SMPX,<sup>236–238</sup> aunque, sorprendentemente, ratones deficientes de este gen no mostraron cambios fenotípicos evidentes.

SMPX ha sido descrito como un gen diana de Nkx-2.5 en estudios realizados en un modelo de ratón portador de un alelo nulo de este factor de transcripción,<sup>234</sup> y como un gen de respuesta al estrés mecánico en músculo esquelético.<sup>239</sup> Además de Nkx-2.5, en el promotor del gen de la SMPX se ha descrito la presencia de posibles sitios de unión a MEF-2, MyoD, E47 y RSRFC4, factores de transcripción específicos de tejido muscular, implicados en el control de la miogénesis del músculo esquelético y en la formación y desarrollo del miocardio.<sup>239</sup> Estas evidencias confirman la expresión preferente de la SMPX en estos tipos celulares. Sin embargo, también se ha detectado la expresión (aunque en bajos niveles y de forma transitoria en algunos casos) en órganos como el estómago, el intestino y las venas pulmonares.<sup>234,240</sup>

En células C2C12 (mioblastos de músculo esquelético) confluentes, la sustitución del suero fetal del medio de cultivo por un 2 % de suero de caballo induce diferenciación celular. En dichas condiciones, los mioblastos se fusionan y forman miotubos (células alargadas y polinucleadas) en casi la totalidad del cultivo en los tres a cinco días posteriores a dicho tratamiento. En este proceso se ha observado un aumento de la expresión de SMPX concomitante con la formación de los miotubos.<sup>234</sup> Aunque los mecanismos moleculares implicados en esta diferenciación no están del todo descritos, se han involucrado algunas vías metabólicas conocidas como la MKK3/p38.<sup>235,241</sup> Otros estudios realizados en esta línea celular sugieren la asociación de SMPX a los costámeros, implicados en el mantenimiento de la integridad muscular y la respuesta al estiramiento mecánico. Igualmente, esta proteína ha sido co-localizada con la F-actina en el citoesqueleto periférico, y con proteínas de adhesión focal como la vinculina, la paxilina y la integrina  $\beta 1$ .<sup>235</sup> La sobre-expresión de SMPX en células C2C12 provoca la

## **INTRODUCCIÓN**

---

formación de lamelipodia, que favorece el proceso de migración celular, en el cual está implicado el citoesqueleto de F-actina.<sup>234,235</sup> No obstante, y a pesar de estas evidencias, se desconoce el papel específico de la SMPX en dichos procesos.

# ***HIPÓTESIS Y OBJETIVOS***



Patologías cardiovasculares como la aterosclerosis, la restenosis y el aneurisma de aorta abdominal tienen en común un proceso de remodelado vascular que permite la reparación y adaptación del vaso como respuesta a un daño.<sup>242,243</sup> En estos procesos, las CMLV experimentan importantes cambios en su actividad migratoria, proliferativa y sintética como consecuencia de una alteración en la expresión génica, regulada por un reducido número de factores de transcripción.<sup>184,244,245</sup>

Recientemente, nuestro grupo ha identificado al receptor nuclear NOR-1 como un factor de transcripción implicado en la cardiopatía isquémica. NOR-1 se sobre-expresa en lesiones ateroscleróticas de pacientes con esta patología y en lesiones inducidas por dietas aterogénicas o por lesión intravascular (angioplastia) en el modelo porcino.<sup>160,179</sup> NOR-1 también está implicado en la proliferación de CMLV y células endoteliales inducida por suero, factores de crecimiento, trombina y LDL,<sup>159,160,179</sup> en la migración de las CMLV en un modelo *in vitro* de “reparación de herida”,<sup>160</sup> y en el engrosamiento de la neointima como respuesta a daño vascular.<sup>129,167,168</sup> No obstante, y a pesar de que este receptor y los otros miembros de la familia NR4A han sido involucrados en dichos procesos, se desconoce la identidad de la mayoría de sus genes diana.

Resultados preliminares de nuestro grupo procedentes de estudios de expresión génica diferencial (mediante *microarrays*) de CMLV que sobre-expresaban NOR-1, Nurr1 o Nur77, sugerían la regulación por estos tres receptores de la A2M, y de la SMPX por parte de NOR-1. La A2M es una proteína que juega un papel importante en la regulación de la proliferación y supervivencia de las CMLV,<sup>223,246,247</sup> y en el control de la actividad metaloproteínasa a nivel local. Por su parte, la SMPX es una proteína asociada al citoesqueleto y que parece estar involucrada con cambios en la forma celular<sup>234</sup> y la motilidad de células de músculo esquelético.<sup>235</sup> Su posible regulación por NOR-1 podría estar relacionada con el papel atribuido a este receptor en la migración de las CMLV.<sup>160</sup>

Teniendo en cuenta estos antecedentes, nuestra **hipótesis** es que NOR-1 regula mecanismos moleculares implicados en el remodelado vascular y en el cambio fenotípico que experimentan las células musculares, a través de la modulación de genes como A2M y SMPX.

Los **objetivos** de esta tesis han sido:

1. Identificar genes regulados por NOR-1 en CMLV y caracterizar los mecanismos a través de los cuales se produce dicha regulación.
2. Analizar el papel de la anti-proteinasa A2M en el remodelado vascular mediado por los receptores NR4A.
3. Caracterizar la regulación por NOR-1 de la proteína asociada a citoesqueleto SMPX y establecer su implicación en la diferenciación celular.

# ***MATERIALES Y MÉTODOS***



## **1. MUESTRAS HUMANAS DE TEJIDO**

Las muestras humanas de arterias (aorta, coronaria y mamaria interna) proceden de pacientes sometidos a trasplante de corazón, realizado en la División de Cardiología y Cirugía Cardíaca del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, de Barcelona. Por su parte, las muestras de músculo esquelético proceden de amputaciones de extremidades inferiores de pacientes con arteriopatía ocluyente e isquemia irreversible de la extremidad. Estas intervenciones se realizaron en el Servicio de Angiología, Cirugía Vascul y Endovascular del mismo hospital. En todos los casos se contó con la aprobación del Comité de Ética de dicha institución, de acuerdo a la Declaración de Helsinki.

## **2. CULTIVOS CELULARES**

La mayor parte de los experimentos se llevaron a cabo en cultivos celulares. Tanto los cultivos primarios como las líneas celulares, se cultivaron a 37 °C en atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> y 21% de O<sub>2</sub> (condiciones óptimas).

### **2.1. Cultivos primarios**

#### **2.1.1. CMLV humanas**

Se obtuvieron mediante la técnica de explantes modificada,<sup>248</sup> a partir de fragmentos de aorta de pacientes trasplantados en la Unidad de Trasplante Cardíaco de la División de Cardiología y Cirugía Cardíaca del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Brevemente, en condiciones de esterilidad se eliminó la grasa y el tejido conectivo adherido, se abrió longitudinalmente el vaso y se raspó la cara interna cuidadosamente con un bisturí para eliminar las células endoteliales. Con la ayuda de unas pinzas curvas, la capa media fue separada de la adventicia y seccionada en pequeños segmentos (explantes) de aproximadamente 2 mm<sup>2</sup>, que se colocaron en placas estériles con medio de cultivo completo (Tabla M1). Los explantes se incubaron en condiciones

## MATERIALES Y MÉTODOS

óptimas y el medio de cultivo fue reemplazado cada tres días. Después de 1-2 semanas las CMLV comenzaron a migrar del explante y a proliferar. Una vez alcanzada una confluencia aproximada del 80%, las células fueron tripsinizadas lavando previamente con PBS (composición en epígrafe 15) atemperado, se añadió el mínimo volumen de tripsina (25300, Gibco) para cubrir toda la monocapa celular, se incubó (menos de 2 min) hasta que todas las células estuviesen suspendidas y se añadió medio completo atemperado (cinco veces el volumen de tripsina añadido). La suspensión de células fue centrifugada a  $290 \times g$  durante 10 min a temperatura ambiente y el sedimento obtenido se resuspendió en un volumen adecuado de medio de cultivo. El número de células fue determinado por tinción con azul de tripano al 0,4% (*Trypan blue*, Sigma) y la ayuda de una cámara de *Neubauer*, y se sembraron a no menos de  $10^4$  células/cm<sup>2</sup>. Los experimentos se realizaron con células entre los pases 3 y 5, y la congelación de éstas se realizó en FBS con un 7,5% de DMSO (Sigma), a razón de  $10^6$  células/mL, y posterior congelación en N<sub>2</sub> líquido.

**Tabla M1. Medios de crecimiento de las CMLV humanas, murinas y de rata.**

COMPONENTES	CMLV humanas	CMLV murinas y de rata
Medio base	M199 (22340, Gibco)	DMEM (L0102, BioWest)
Suero fetal bovino (FBS) (04-001-1, Biological Industries)	20%	10% (para las murinas) 20% (para las de rata)
Suero humano (Banc de Sang i Teixits)	2%	-
L-Glutamina (25030, Gibco)	2 mM	2 mM
Penicilina-Estreptomicina (15140, Gibco)	100 U/mL (penicil.) 100 µg/mL (estrept.)	100 U/mL (penicil.) 100 µg/mL (estrept.)

### 2.1.2. CMLV murinas

Se obtuvieron a partir de la aorta extraída según se describe en el epígrafe 13.3. En condiciones de esterilidad, la capa endotelial fue eliminada al sumergir la aorta en una solución de colagenasa tipo 2 (4176, Worthington Biochemical Corp.) a 150 U/mL en medio base (Tabla M1) durante 15 min a

37 °C. Se separó la adventicia con la ayuda de unas pinzas curvas y la capa media fue seccionada en explantes de 1 mm<sup>2</sup> aproximadamente, colocados en placas con medio de cultivo (Tabla M1) e incubados en condiciones óptimas de crecimiento, cambiando el medio de cultivo por medio fresco cada tres días. A las 1-2 semanas posteriores, las células comenzaron a migrar del explante y a proliferar. La tripsinización, subcultivo y congelación de estas células se realizaron de manera similar a las CMLV humanas. Las células se emplearon entre los pases 3 y 5.

### 2.1.3. CMLV de rata

Se obtuvieron a partir de la aorta de ratas albinas de la línea Wistar, mantenidas en la Unidad de Experimentación Animal del Centro de Investigación Cardiovascular (CSIC-ICCC) de Barcelona. La extracción de la aorta y posterior obtención de las CMLV se realizó de forma similar a la obtención de CMLV murinas. La composición del medio de crecimiento de estas células se muestra en la Tabla M1. La tripsinización, subcultivo y congelación se hicieron de forma similar a las CMLV humanas, y se usaron entre los pases 3 y 5.

### 2.1.4. HSMM (*Human Skeletal Muscle Myoblasts*)

Se utilizaron mioblastos de músculo esquelético humano de la casa comercial Lonza, que también proporcionó el medio de crecimiento (Tabla M2), la tripsina (CC-5012) y la solución de inactivación de ésta última (CC-5002). Estas células se usaron entre los pases 3 y 5, y fueron cultivadas en medio de crecimiento hasta una confluencia siempre inferior al 70%. La tripsinización, subcultivo y congelación de las HSMM se hicieron de manera similar a las CMLV humanas. Según el caso, se indujo la diferenciación de estas células, que se realizó en presencia de suero de caballo (Tabla M2) durante 5 días, en condiciones óptimas de incubación y cambiando el medio cada 24 h.

**Tabla M2. Medios de crecimiento y diferenciación de las HSMM.**

<b>CRECIMIENTO</b>		<b>DIFERENCIACIÓN</b>	
SkBM-2 (CC-3245, Lonza)		DMEM/F-12 (21331, Gibco)	
Suplementos (CC-3244, Lonza):		Suero de caballo (26050, Gibco)	2%
FBS	10%	HEPES (15630, Gibco)	15 mM
L-Glutamina	2 mM	L-Glutamina (25030, Gibco)	2,5 mM
Dexametasona	0,1%	Piruvato de sodio (03-042-1, Biological Industries)	1 mM
rhEGF	0,1%		
GA-1000	0,1%		

## 2.2. Líneas celulares

Se emplearon las líneas celulares siguientes: HeLa (CCL-2, ATCC; células epiteliales de adenocarcinoma de cérvix humano), NIH/3T3 (CRL-1658, ATCC; fibroblastos murinos de origen embrionario) y HEK-293T o 293T (CRL-3216, ATCC; células epiteliales humanas de riñón de origen embrionario). Las líneas se cultivaron en medio DMEM suplementado con FBS, L-glutamina y antibióticos al igual que las CVLV murinas (Tabla M1), y su tripsinización y congelación se realizaron de manera similar a las CMLV humanas. El subcultivo, en términos de número de células/cm<sup>2</sup>, dependió del experimento.

## 3. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DEL ARN MENSAJERO

### 3.1. Obtención de ARN total

En la obtención de ARN se utilizaron dos técnicas diferentes: la extracción con solventes orgánicos y el uso de columnas de intercambio iónico.

### 3.1.1. Extracción con solventes orgánicos

Se basa en el método de Chomczynski<sup>249</sup> que, mediante el empleo de sales, urea, fenol y otros detergentes que actúan como agentes desnaturalizantes, permite separar el ARN disuelto en medio acuoso del DNA y de las proteínas que quedan en la fase orgánica e interfase. Para ello, las células se lisaron con el reactivo *Ultraspec*<sup>TM</sup> (Biotecx), a razón de 500  $\mu\text{L}/10\text{ cm}^2$  de superficie de cultivo. El lisado celular se recogió con la ayuda de un raspador, se añadió 200  $\mu\text{L}$  de cloroformo por cada mL de *Ultraspec*<sup>TM</sup>, se agitó la mezcla vigorosamente durante 15 s y se incubó 5 min en hielo. Mediante centrifugación (12.000  $\times$  g, 15 min a 4 °C), se separó la fase superior (fase acuosa), a la que se añadió el mismo volumen de isopropanol para precipitar el ARN. Se agitó la mezcla vigorosamente durante 10 s, se incubó en hielo durante 10 min y se centrifugó a 12.000  $\times$  g y 4 °C durante 20 min para precipitar el ARN. El precipitado obtenido se lavó dos veces con etanol al 70%, se dejó secar y se disolvió en H<sub>2</sub>O libre de nucleasas o tratada previamente con DEPC, incubando a 65 °C durante 5 min para facilitar su disolución. Las muestras se guardaron a -80 °C hasta su análisis.

La extracción de ARN a partir de tejido también se realizó mediante este método. Para ello, no más de 100  $\mu\text{g}$  de tejido fue finamente triturado en N<sub>2</sub> líquido, con la ayuda de un mortero de porcelana. A esta cantidad de tejido se añadió 1 mL de *Ultraspec*<sup>TM</sup> y se homogeneizó con la ayuda de un homogenizador *Heidolph DIAX 900* (Sigma). El resto del procedimiento se realizó como se ha descrito previamente y el ARN obtenido se guardó a -80 °C.

### 3.1.2. Extracción mediante columnas de intercambio iónico

Se realizó mediante el kit comercial *RNeasy Micro Kit* (Qiagen), que se basa en la capacidad de adhesión del ARN a una membrana de sílice, en presencia de altas concentraciones de sales y etanol. Se usó esta técnica para la extracción de ARN a partir de células transfectadas con ARN de interferencia (*siRNA*) porque permite la eliminación de las moléculas de ARN de bajo peso molecular que podrían interferir en un posterior análisis por PCR a tiempo

real. Para ello, las células se lisaron con el reactivo RLT (tampón de lisis que contiene tiocianato de guanidinio) suplementado con  $\beta$ -mercaptoetanol (10  $\mu$ L/mL de RLT). El lisado celular se recogió con la ayuda de un raspador, se añadió etanol, se transfirió la mezcla a la columna y se realizó centrifugaciones sucesivas para fijar, lavar y eluir el ARN con H<sub>2</sub>O libre de nucleasas o tratada previamente con DEPC. Las muestras se guardaron a -80 °C hasta su análisis.

### 3.2. Determinación de la cantidad y calidad de ARN

El ARN se cuantificó mediante el espectrofotómetro *NanoDrop* (Thermo Scientific). Con este método se evaluó la pureza del ARN al determinar la absorbancia de la muestra a 230, 260 y 280 nm, y calculando los cocientes 260/280 y 260/230, que deben estar entre 1,8 - 2,0 y 1,8 - 2,2, respectivamente.

La integridad del ARN se comprobó mediante electroforesis en condiciones libres de nucleasas, en geles de agarosa al 1,2% y con tampón MOPS (composición en epígrafe 15). Cada muestra se preparó mezclando aproximadamente 0,5  $\mu$ g de ARN con tampón de carga (Tabla M3) y se calentó a 65 °C durante 10 min. La electroforesis se realizó a 60 V durante 1 h y los geles se examinaron con luz ultravioleta. La integridad de cada muestra se estimó según el estado y la relación de intensidad de las bandas correspondientes al ARN ribosomal (18S y 28S).

**Tabla M3. Tampón de carga para electroforesis de ARN.**

<b>COMPONENTES</b>	
Formaldehído 37 %	2,7 mM
Formamida desionizada	15,4 M
Glicerol	780 mM
Azul de bromofenol	1,8 mg/mL
Bromuro de etidio	7,2 mg/L
Tampón MOPS	

### 3.3. PCR a tiempo real

La determinación de los niveles de ARNm de los genes de interés se realizó mediante PCR a tiempo real (RT-PCR, *real-time PCR*), que permite amplificar y cuantificar de forma simultánea el producto de la amplificación.

Previamente, se obtuvo el ADN de cadena sencilla complementaria o ADN copia (ADNc) mediante transcripción reversa (retrotranscripción) del ARN total obtenido, utilizando el *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems). La reacción de síntesis tuvo lugar en un termociclador *GeneAmp® PCR System 9700* (Applied Biosystems) y se realizó en un volumen final de 20 µL, como se describe en la Tabla M4. El ADNc obtenido (contenido en la reacción final) se conservó a -20 °C hasta su utilización.

**Tabla M4. Composición y condiciones de reacción de la retrotranscripción.**

COMPOSICIÓN		CONDICIONES	
ARN total	0,5 - 1,0 µg	25 °C	10 min
Tampón de reacción	1 X	37 °C	120 min
Hexámeros aleatorios	1 X	85 °C	5 min
Mezcla de dNTPs	4 mM		
Enzima <i>MultiScribe™</i>	2,5 U		
H <sub>2</sub> O desionizada libre de nucleasas			

Las reacciones de RT-PCR a partir de ADNc se realizaron en un volumen final de 20 µL, por duplicado (9 µL/pocillo) en placas de 384 pocillos (Applied Biosystems), en un termociclador *7900HT Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) y mediante uno de los dos sistemas siguientes: RT-PCR con *SYBR-Green* y con sondas específicas tipo *TaqMan®*.

#### 3.3.1. RT-PCR con *SYBR-Green*

El *SYBR-Green* es una molécula orgánica que se asocia a la doble hélice de ADN durante la síntesis de ésta última y forma un complejo ADN/*SYBR-Green*, cuyo pico de absorción y emisión se produce a 498 y 522 nm, respectivamente. En este estudio, se utilizó la *FastStart Universal SYBR Green Master* (Roche), una mezcla que contiene los elementos necesarios

## MATERIALES Y MÉTODOS

para la reacción de PCR, incluido el *SYBR-Green*. En la Tabla M5 se muestran los oligonucleótidos específicos empleados en las reacciones, diseñados mediante la herramienta *NCBI/Primer-BLAST* a partir de secuencias obtenidas de la base de datos generada por el proyecto *Ensembl* ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)).

**Tabla M5. Pares de oligonucleótidos.**

<b>GEN</b>	<b>SECUENCIA (5' - 3')</b>	<b>GEN</b>	<b>SECUENCIA (5' - 3')</b>
MX2	ATCGCCGTCATCGGGGACCA CCCATGCCTCACAGGGCTGC	ACTA2	TAGCACCCAGCACCATGAAG CTGCTGGAAGGTGGACAGAG
PROS1	AGAGGCCAAACTTTTTGTCAAAGCA AGACCTCCCTGGCTTCTTCT	PXN	CCCTGCTGGCGGACTTG GCACGGCAATCTCCTGGTAT
ABLIM1	TCCCCTGTGTACAGCCGCCA CGCTGGACGGCTCATTGCCA	TAGLN	TGGCTGAAGAATGGCGTGAT CACCTGCTCCATCTGCTTGA
MYL4	ATGCCGAGGTGCTGCGTGTG TGCCCTGCTCCTTGTGCGG	CALD1 (1)	AGGAGGAGAGGGAACAAGGTT TCTTTTGTCTTGCTCGGCTT
EDNRA	CACCACTTTTCGTGGCACAG TTGAGCCATTGCTGGGTAGG	CALD1 (2)	GTCTGTGCAGAAAAGTGGTGT CTGCTCCAGTCTGCTGTCAA
ADAMTSL4	GAAGCAGGAGCAGGAAGCTGG CAGAGCCACATTCGGAGGAG	MYH10	CTCTACCAAGCTGATGGCA TTCCAGGACACCGTTACAGC
IGF1R	ACGAGTGGAGAAATCTGCGG ATGTGGAGGTAGCCCTCGAT	ACTB	GCACTCTCCAGCCTTCCTT AATGCCAGGGTACATGGTGG
EIF2AK3	CTCAGCGACGCGAGTACC CGGTCCGCAACTGTCTCAT	TPM1	GGTCCTTTCCGACAAGCTGA TGGCATGAGCCACTTCTCT

La composición y condiciones de reacción se describen en la Tabla M6.

**Tabla M6. Composición y condiciones de la reacción de RT-PCR con SYBR-Green.**

<b>COMPOSICIÓN</b>		<b>CONDICIONES</b>	
ADNc (reacción de retrotranscripción)	≤ 2,0 μL	95 °C	10 min
<i>FastStart Universal SYBRGreen Master</i>	1 X	95 °C	10 s
Oligonucleótido <i>Forward</i>	300 nM	60 °C	30 s
Oligonucleótido <i>Reverse</i>	300 nM	95 °C	15 s
H <sub>2</sub> O desionizada libre de nucleasas		60 °C	15 s
		95 °C	15 s

### 3.3.2. RT-PCR con sondas específicas

La RT-PCR empleando sondas específicas permite medir la producción de fragmentos de PCR mediante un sistema de dos oligonucleótidos y una sonda que hibrida específicamente hacia el centro del fragmento a amplificar. Dicha sonda está marcada con dos fluorocromos: uno en su extremo 5' y una molécula en el extremo 3' que bloquea la emisión de fluorescencia por proximidad (*quencher*). De este modo, cuando progresa la síntesis de ADN, la polimerasa hidroliza la sonda mediante su actividad exonucleasa 5'-3', provocando la liberación del fluorocromo y la consiguiente emisión de fluorescencia. La detección de esta fluorescencia dependerá del fluorocromo en particular, en este caso la 6-carboxifluoresceína (*FAM*), cuyos picos de absorción y emisión son 492 y 517 nm, respectivamente. Se utilizó la mezcla *TaqMan 2X Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems), que contiene los elementos necesarios para la reacción de RT-PCR, y se emplearon las sondas específicas que se indican en la Tabla M7.

**Tabla M7. Sondas específicas.**

GEN	SONDA (CASA)	
	Humano	Ratón
NOR-1	Hs00175077_m1 (Applied Biosystems)	Mm00450074_m1 (Applied Biosystems)
Nurr1	Hs00428691_m1 (Applied Biosystems)	Mm00443056_m1 (Applied Biosystems)
Nur77	Hs00172437_m1 (Applied Biosystems)	Mm00439358_m1 (Applied Biosystems)
A2M	Hs00163474_m1 (Applied Biosystems)	Mm00558642_m1 (Applied Biosystems)
MMP2	Hs00234422_m1 (Applied Biosystems)	Mm.PT.58.9606100 (IDT)
MMP9	Hs00234579_m1 (Applied Biosystems)	Mm.PT.58.10100097 (IDT)
TIMP1	Hs01092511_m1 (Applied Biosystems)	-
TIMP2	Hs00234278_m1 (Applied Biosystems)	-
SMPX	Hs00204934_m1 (Applied Biosystems)	Mm00452594_m1 (Applied Biosystems)
GAPDH	Hs99999905_m1 (Applied Biosystems)	-
TBP	Hs.PT.39a.22214825 (IDT)	Mm00446973_m1 (Applied Biosystems)

La composición y condiciones de reacción se describen en la Tabla M8.

Tabla M8. Composición y condiciones de la reacción de RT-PCR con sondas específicas.

COMPOSICIÓN		CONDICIONES	
ADNc (reacción de retrotranscripción)	≤ 2,0 µL	50 °C	2 min
TaqMan 2X Universal PCR Master Mix	1 X	95 °C	10 min
Sonda específica	1 X	95 °C	10 s
H <sub>2</sub> O desionizada libre de nucleasas		60 °C	30 s

Los niveles de ARNm se determinaron a partir de los valores de *Ct* obtenidos en las reacciones de RT-PCR mediante recta patrón o por el método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , tras la normalización por la expresión de un gen endógeno como TBP o GAPDH.

## 4. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN PROTEICA

### 4.1. Obtención de extractos proteicos

#### 4.1.1. Extracción de proteínas totales de células en cultivo

La monocapa celular se lavó 2 veces con PBS, se añadió tampón de lisis (Tris-HCl a 10 mM, pH 7,4; SDS al 0,5% y ortovanadato de sodio a 1 mM) calentado a 95 °C, a razón de 80-100 µL/10 cm<sup>2</sup>, y el lisado fue recogido mediante raspado.<sup>250</sup> Cada muestra se congeló a -80 °C para optimizar la lisis, se descongeló para disgregarla mecánicamente pasándola por una aguja jeringa de insulina (aguja 29G), se centrifugó a 11.200 × g durante 5 min para eliminar el material no disgregado y se recogió el sobrenadante (extracto proteico). Este extracto se guardó a -20 °C hasta su análisis y la concentración de proteínas fue determinada como se describe en el epígrafe 4.2.

### 4.1.2. Extracción de proteínas totales de sobrenadante de CMLV en cultivo

Para obtener las proteínas del sobrenadante, fue necesario cultivar las células en medio sin FBS ni suero humano. Transcurrido el tiempo correspondiente, el medio de cultivo se centrifugó a  $290 \times g$  durante 20 min a temperatura ambiente para eliminar las células remanentes y el sobrenadante obtenido se añadió a columnas de exclusión (*Amicon Ultra-4 Centrifugal Filters*, Millipore) que descartan proteínas con un peso molecular inferior a 10 kDa. Las columnas se centrifugaron a  $240 \times g$  y temperatura ambiente en ciclos de 15 min. Antes de cada uno de estos ciclos, se añadió PBS hasta pasar un volumen total de este tampón equivalente a cinco veces el volumen del sobrenadante inicial. De esta forma, las proteínas quedaron disueltas en PBS en un volumen final de 250  $\mu\text{L}$  aproximadamente y se congelaron a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  hasta su utilización. La cantidad y/o actividad de una proteína específica en el sobrenadante celular se estimó según el número de células y el contenido de proteínas totales de la monocapa celular de la cual procede.

### 4.1.3. Extracción de proteínas totales de tejido

Los tejidos fueron finamente triturados en  $\text{N}_2$  líquido con la ayuda de un mortero de porcelana. Se añadió 1 mL de tampón de lisis suplementado con un cóctel de inhibidores de proteasas (*CIP, Protease Inhibitor Cocktail Set I*, Calbiochem) (Tabla M9) por cada 100  $\mu\text{g}$  aproximadamente de tejido triturado y se homogenizó en hielo con la ayuda de un homogenizador *Heidolph DIAX 900* (Sigma). Las muestras se congelaron a  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  para facilitar la lisis, se descongelaron y se centrifugaron a  $13.000 \times g$  durante 10 min a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  para eliminar el tejido no disgregado. Este último paso se repitió sucesivamente hasta que no se observó más precipitado. El sobrenadante final obtenido (extracto proteico) se congeló a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  hasta su utilización y la concentración de proteínas fue determinada como se describe en el epígrafe 4.2.

**Tabla M9. Tampón de lisis para proteínas de tejido.**

<b>COMPONENTES</b>	
HEPES	50 mM
NaCl	100 mM
Glicerol-2-fosfato	100 mM
EGTA	0,5 mM
Glicerol	10%
TWEEN 20	0,1%
DTT	1 mM
CIP	1 X
H <sub>2</sub> O desionizada	

#### 4.1.4. Extracción de proteínas nucleares y citosólicas de CMLV en cultivo

Los extractos proteicos nucleares y citosólicos se obtuvieron mediante incubaciones con tampones hipotónicos e hipertónicos, a partir de CMLV cultivadas en placas de 100 mm de diámetro (55 cm<sup>2</sup>) hasta un 80-100% de confluencia. Todo el proceso se realizó a 4 °C. Cada placa se lavó dos veces con PBS frío y la monocapa se recogió en PBS frío suplementado con CIP, con ayuda de un raspador y sobre hielo. La suspensión se centrifugó a 1.800 × g durante 7 min, el precipitado se resuspendió en 300 µL de tampón A (hipotónico) (Tabla M10) y se incubó durante 15 min en hielo, agitando cada 5 min con vórtex. Se añadió Nonidet P-40 hasta la concentración final de 0,6% y se agitó de igual manera durante 10 s. La mezcla se centrifugó a 16.000 × g y 4 °C durante 30 s, y el sobrenadante obtenido (proteínas citoplasmáticas) se guardó a -80 °C hasta su utilización. Por otra parte, el precipitado de la centrifugación anterior se resuspendió en 500 µL de tampón A para eliminar el detergente (en este paso se comprobó la integridad de los núcleos al microscopio) y se centrifugó en las mismas condiciones anteriores. Se descartó el sobrenadante y el precipitado obtenido se resuspendió en 50 µL de tampón B frío (hipertónico) (Tabla M10), que facilita la extracción de proteínas nucleares. La mezcla se incubó durante 30 min a 4 °C con rotación orbital suave, se centrifugó a 16.000 × g y 4 °C durante 5 min, y el sobrenadante obtenido (proteínas nucleares) se guardó a -80 °C hasta su utilización. Las fracciones de proteínas

citoplasmáticas y nucleares fueron cuantificadas como se describe en el epígrafe 4.2.

**Tabla M10. Tampones A y B.**

<b>COMPONENTES</b>	<b>TAMPÓN A</b>	<b>TAMPÓN B</b>
HEPES	10 mM	25 mM
KCl	10 mM	50 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM	1,5 mM
DTT	1 mM	1 mM
CIP	1X	1X
NaCl	-	400 mM
Glicerol	-	10%
H <sub>2</sub> O desionizada		

#### **4.2. Determinación de la concentración proteica**

La concentración proteica se determinó mediante el método del ácido bicinconínico (*BCA<sup>TM</sup> protein assay reagent*, Pierce), basado en el método de Lowry.<sup>251</sup> En esta técnica las proteínas reducen el Cu<sup>+2</sup> a Cu<sup>+1</sup> en condiciones alcalinas a 37 °C y cada ión Cu<sup>+1</sup> se une a dos moléculas de ácido bicinconínico, dando lugar a un producto púrpura con un máximo de absorción a 562 nm. En nuestro caso, la absorbancia del producto coloreado se determinó en un espectrofotómetro *SPECTRA MAX 250* (Molecular Devices) y la concentración de proteínas de cada muestra fue calculada interpolando los valores de absorbancia obtenidos, en una recta patrón con concentraciones conocidas de albúmina de suero bovino.

#### **4.3. Western blot**

La electroforesis de proteínas en condiciones desnaturizantes y geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) fue realizada según la técnica descrita por Laemmli,<sup>252</sup> empleando geles de entre 7,5 y 15% de este polímero en el gel separador, según el tamaño de la(s) proteína(s) de interés a separar. En la Tabla M11 se muestra la composición de los geles separador y apilador.

**Tabla M11. Composición de los geles de poliacrilamida.**

<b>COMPONENTES</b>	<b>GEL SEPARADOR</b>	<b>GEL APILADOR</b>
Tris-HCl (pH 8,8)	375 mM	-
Tris-HCl (pH 6,5)	-	125 mM
Acrilamida/bis-acrilamida 30% (A3699, Sigma)	7,5-15%	4%
SDS	0,1%	0,1%
Persulfato de amonio	0,1%	0,075%
TEMED (T9281, Sigma)	0,08%	0,1%
H <sub>2</sub> O desionizada		

Las muestras se prepararon en tampón Laemmli con condiciones reductoras (Tabla M12), se calentaron a 95 °C durante 10 min y se aplicaron en el gel. La electroforesis se realizó a 80-100 V y en presencia de un tampón de recorrido de Tris-glicina (3 g/L de Tris base, 14,5 g/L de glicina y 0,1% de SDS). Como marcador de peso molecular se empleó el *HyperPAGE Prestained Protein Marker* (BIO-33066, Bioline).

**Tabla M12. Tampón Laemmli.**

<b>COMPONENTES</b>	
Tris-HCl	125 mM
SDS	1 %
Glicerol	5 %
Azul de bromofenol	0,003 %
β-mercaptoetanol	1 %
H <sub>2</sub> O desionizada	

La transferencia de las proteínas a la membrana de PVDF (*Immobilon<sup>®</sup>-P Transfer Membrane, Pore size: 0,45 μM; Millipore*) previamente activada con metanol, fue realizada a 200 mA y 4 °C durante 90 min, en tampón de transferencia (25 mM de Tris-HCl; 192 mM de glicina; 20% de metanol). De forma opcional, la eficacia de la transferencia se comprobó por tinción breve con una solución de *Ponceau* (0,2 % de Rojo *Ponceau*; 1 % de ácido acético glacial) y, después de lavar con H<sub>2</sub>O destilada, las membranas se saturaron con solución de bloqueo (5 % de leche desnatada en polvo *Sveltesse<sup>®</sup>* en TBS-Tween, o con la solución *AdvanBlock<sup>TM</sup>-PF Protein Free Blocking Solution* [Advansta]) durante 1 h a temperatura ambiente o durante 24 h a 4 °C. La composición del TBS y el TBS-Tween se indica en el epígrafe 15.

Posteriormente, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario específico (Tabla M13) preparado en solución de bloqueo a la dilución de trabajo adecuada, a 4 °C con agitación durante 16 h, o a temperatura ambiente durante 1 h. Acto seguido se realizaron dos lavados sucesivos con TBS-Tween y otros dos con TBS, de 5 min cada uno. Las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente (Tabla M13) preparado en solución de bloqueo, durante 1 h a temperatura ambiente con agitación y luego fueron lavadas como se describió anteriormente.

**Tabla M13. Anticuerpos utilizados en la técnica de *Western blot*.**

<b>ANTICUERPOS</b>	<b>DILUCIÓN (V:V)</b>	<b>REFERENCIA (CASA)</b>
<b>Primarios</b>		
anti-NOR-1	1:1.000	H00008013-M06 (Abnova)
anti-A2M	1:750	HPA002265 (Sigma)
anti-MMP2	1:5.000	ab51125 (Abcam)
anti-MMP9	1:1.000	ab38898 (Abcam)
anti-TIMP1	1:1.500	MAB13429 (MerckMillipore)
anti-TIMP2	1:1.500	ab28260 (Abcam)
anti-SMPX	1:1.000	AV41597-100UG (Sigma)
anti-FLAG	1:3.000	F1804-200UG (Sigma)
anti-MYH10 (Smemb)	1:6.000	ab684 (Abcam)
anti-Caldesmon	1:30.000	ab32330 (Abcam)
anti-MyHC	1:1.000	sc-20641 (Santa Cruz Biotechnologies)
anti-p27	1:600	610242 (BD Biosciences)
anti-MYOM1	1:1.000	sc-30388 (Santa Cruz Biotechnologies)
	1:1.000	SAB1304848 (Sigma)
	1:10.000	ab201228 (Abcam)
anti-β-actina	1:40.000	A5441 (Sigma)
<b>Secundarios</b>		
anti-IgG de ratón	1:2.000	P0161 (DAKO)
anti-IgG de conejo	1:2.000	P0448 (DAKO)
anti-IgG de cabra	1:2.000	P0449 (DAKO)

El revelado se efectuó mediante reacción quimioluminiscente incubando las membranas durante 5 min con las soluciones del sistema *Supersignal<sup>TM</sup> West Dura* (Pierce), y empleando películas autorradiográficas (*CURIX RP2 Plus X-ray films*; AGFA) colocadas sobre las membranas impermeabilizadas durante un tiempo que osciló entre 30 s y 5 min. Las películas se revelaron por

procedimientos fotográficos estándares empleando las soluciones reveladora (G153) y fijadora (G354) de la misma casa. Las películas se escanearon en un densitómetro *GS-800* (BIO-RAD) y la cuantificación relativa de las bandas se realizó mediante el *software Quantity-One* (BIO-RAD).

### 4.4. Inmunocitoquímica de fluorescencia

Esta técnica permitió localizar y detectar de forma simultánea varias proteínas o estructuras celulares de interés mediante la combinación de diferentes moléculas y anticuerpos conjugados con fluorocromos. En nuestro caso, casi la totalidad del procedimiento se realizó a temperatura ambiente a menos que se indique otra temperatura y la detección se realizó según el caso por Microscopía Confocal o por Microscopía de Fluorescencia Convencional.

#### 4.4.1. Detección mediante Microscopía Confocal

Se realizó en CMLV humanas transducidas con lentivirus (epígrafe 10.3). Para ello, las células se sembraron en placas individuales ( $\mu$ -Dish<sup>35mm,low</sup>, Ibidi) a razón de 25.000 células/placa y, una vez finalizado el procedimiento de transducción, se realizó la detección de las proteínas de interés. Se retiró el medio de cultivo, las células se lavaron rápidamente con PBS y se fijaron durante 15 min con una solución de paraformaldehído al 4% en tampón fosfato (PB; composición en epígrafe 15). Acto seguido, se lavaron dos veces con PBS (5 min) y las células se permeabilizaron (0,5% de Tween20 y 0,1% de BSA, en PBS) durante 5 min. A continuación, se añadió la solución de bloqueo (1% de BSA en PBS, filtrada con filtro de 0,45  $\mu$ m) durante 30 min, se lavaron las placas como se describió anteriormente, se añadió el *Image-iT® FX Signal Enhancer* (I36933, Invitrogen) y se incubaron durante 30 min. Seguidamente, se realizaron dos lavados iguales a los anteriores y se incubaron las células con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla M16), diluido en solución de bloqueo a 4 °C con agitación durante 16 h. A continuación, las placas se lavaron como se ha descrito se añadió el anticuerpo secundario correspondiente (Tabla M16) preparado en solución

de bloqueo y se incubaron protegidas de la luz durante 1 h. Según el caso y en la misma solución del anticuerpo secundario, se añadió el reactivo *Hoechst 33342* (H3570, Invitrogen) diluido 1:500 para la tinción de núcleos, y el reactivo *Alexa Fluor 633 phalloidin* (A22284, Invitrogen) diluido 1:40, una variante de la faloidina que permite la detección de la F-actina del citoesqueleto. Después de dos lavados sucesivos con PBS, se realizó el montaje de las muestras con el medio *ProLong® Gold antifade reagent* (P36930, Invitrogen) y un cubreobjeto de vidrio, evitando la formación de burbujas. Las preparaciones se dejaron secar durante al menos 24 h protegidas de la luz, y las imágenes se capturaron mediante el equipo *DMIRE2 Confocal Microscopy* (Leica) y el programa *Confocal Software* (Leica).

**Tabla M14. Anticuerpos usados para la detección con Microscopía Confocal.**

<b>ANTICUERPOS</b>	<b>DILUCIÓN (V:V)</b>	<b>REFERENCIA (CASA)</b>
<b>Primarios</b>		
anti-FLAG	1:100	F1804-200UG (Sigma)
anti-A2M	1:50	HPA002265 (Sigma)
<b>Secundarios</b>		
anti-IgG de conejo ( <i>Alexa Fluor 633</i> )	1:100	A-21070 (Invitrogen)
anti-IgG de ratón ( <i>Alexa Fluor 488</i> )	1:200	A-11001 (Invitrogen)

#### 4.4.2. Detección mediante Microscopía de Fluorescencia Convencional

Se realizó en HSMM transfectadas con ARN de interferencia y posterior diferenciación con suero de caballo (epígrafes 12 y 2.1.3, respectivamente). Para ello, las células fueron cultivadas en placas estándares de 24 pocillos a razón de 20.000 células/pocillo y, una vez terminado el período de diferenciación, la monocapa celular se lavó dos veces con PBS frío y las células se fijaron sobre hielo durante 30 min con paraformaldehído al 4 % en PB. Transcurrido este tiempo, los pocillos se lavaron tres veces con PBS (5 min cada vez) y las células se permeabilizaron (TritonX-100 al 0,5 % en PBS) durante 45 min. Se añadió la solución de bloqueo (8 % de BSA y 0,05 % de TritonX-100 en PBS, filtrada con filtro de 0,45 µm) y se incubaron durante 1 h. Seguidamente, las preparaciones se incubaron a 4 °C con agitación suave durante 16 h con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla M15)

diluido en la solución de bloqueo. Una vez concluido este tiempo, se realizaron tres lavados de 5 min con TritonX-100 al 0,05 % en PBS, y las preparaciones se incubaron protegidas de la luz durante 1 h con el anticuerpo secundario correspondiente (Tabla M15) diluido en la misma solución de bloqueo. Según el caso y en la misma solución del anticuerpo secundario, se añadió el reactivo *Hoechst 33342* (H3570, Invitrogen) diluido 1:500, y el reactivo *Alexa Fluor 488 phalloidin* (A12379, Invitrogen) diluido 1:40. Finalmente, los pocillos se lavaron tres veces con PBS y se capturaron las imágenes en un microscopio de fluorescencia convencional de fase invertida (Leica DM IRE2, Leica Microsystems).

**Tabla M15. Anticuerpos usados para la detección con Microscopía de Fluorescencia Convencional.**

<b>ANTICUERPOS</b>	<b>DILUCIÓN (V:V)</b>	<b>REFERENCIA (CASA)</b>
<b>Primarios</b>		
anti-NOR-1	1:50	H00008013-M06 (Abnova)
anti-SMPX	1:100	PA3-070 (Pierce)
anti-MyHC	1:50	sc-20641 (Santa Cruz Biotech.)
<b>Secundarios</b>		
anti-IgG de conejo (FITC)	1:100	F1262 (Sigma)
anti-IgG de ratón (FITC)	1:100	F0479 (DAKO)

### 4.5. Inmunohistoquímica mediante el sistema avidina-biotina

Esta técnica se utilizó para detectar proteínas en cortes histológicos de arterias humanas (aorta y mamaria) incluidas en parafina. En nuestro caso, gran parte del procedimiento (desde la preparación de las muestras hasta la detección de las proteínas de interés) se realizó a temperatura ambiente a menos que se indique otra temperatura.

#### 4.5.1. Preparación de las muestras

**Fijado e inclusión:** Inmediatamente después de su extracción, las muestras de arterias humanas se sumergieron en una solución de paraformaldehído al 4% en PB, durante 24 h y, una vez transcurrido este tiempo, se sometieron a una deshidratación progresiva y de forma automatizada en el equipo

*Shandon Citadel 2000* (Thermo Electron Corporation). Brevemente, las muestras fueron sumergidas de forma consecutiva en: dos baños (2 × 30 min) del fijador *Glyo-Fixx* (6764265, Shandon), cinco baños (5 × 45 min) de etanol absoluto, tres baños (3 × 45 min) de xilol (251769.2714, Panreac) y dos baños (2 × 1 h) de parafina líquida a 60 °C. Finalmente, las muestras se incluyeron en bloques de parafina usando moldes metálicos según el tamaño del tejido y con la ayuda del dispensador *EG1150H* (Leica). Una vez enfriados, los bloques se desmoldaron, se eliminó la parafina sobrante y se guardaron a temperatura ambiente.

**Preparación del soporte y corte:** Los cortes histológicos se obtuvieron empleando portaobjetos de vidrio, tratados previamente para incrementar la adherencia del tejido. Para ello, los portaobjetos se limpiaron con etanol absoluto, se sumergieron durante 1 h en una solución de 3-aminopropiltriethoxisilano (A3648, Sigma) al 2% en acetona (141007.1214, Panreac), se lavaron dos veces (2 × 15 min) con H<sub>2</sub>O destilada, se secaron a 60 °C durante toda la noche y se guardaron a temperatura ambiente hasta su uso, protegidos del polvo.

A partir de los bloques de parafina se realizaron cortes de 5 µm de grosor empleando un micrótopo *JUNG RM 2005* (Leica) y un baño *HI1210* (Leica) a 42 °C, que se dispusieron en los portaobjetos previamente tratados. Para eliminar el exceso de humedad, las preparaciones se secaron a 40 °C durante al menos 30 min y se guardaron a temperatura ambiente hasta su utilización.

#### 4.5.2. Detección de las proteínas de interés

Las preparaciones fueron desparafinadas y rehidratadas de forma gradual, para lo cual se sumergieron en: dos baños de xilol (2 × 7 min), dos baños de etanol absoluto (2 × 3 min), dos baños de etanol al 95% (2 × 3 min), dos baños de etanol al 70% (2 × 3 min) y un baño de H<sub>2</sub>O destilada durante 5 min. Acto seguido, las preparaciones se incubaron en un baño de vapor a 95 °C durante 20 min dentro de un *Coplin* de vidrio que contenía una solución de desenmascaramiento (citrato de sodio a 10 mM, pH 6). El *Coplin* con las

preparaciones se retiró del baño y se dejó enfriar hasta temperatura ambiente. Las preparaciones se lavaron dos veces con PBS (2 × 5 min) y se sumergieron en una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% en metanol (bloqueo de peroxidasa endógena) durante 30 min. Posteriormente, se lavaron con PBS de igual forma, se les añadió una solución de permeabilización (Tween 20 al 1%, en PBS) y se incubaron durante 5 min. A continuación, se añadió a las preparaciones una solución de bloqueo (10% de suero de cabra y 0,1% de Tween 20, en PBS) y se incubaron durante 30 min en cámara húmeda. Las preparaciones se lavaron brevemente con PBS y se incubaron con las soluciones del *Avidin/Biotin Blocking kit* (SP-2001, Vector Laboratories, Inc.) para bloquear la biotina, los receptores de biotina y los sitios de unión de la avidina presentes en el tejido. Este bloqueo se hizo de la siguiente manera: se incubaron con la solución de avidina durante 15 min, se hicieron tres lavados (con Tween20 al 0,1% y suero de cabra al 1%, en PBS), se incubaron con la solución de biotina otros 15 min y se lavaron nuevamente de igual manera. Acto seguido, se añadió a las preparaciones los anticuerpos primarios anti-A2M (HPA002265, Sigma) o anti-SMPX (AV41597-100UG, Sigma), diluido en la solución de lavado anterior, y se incubaron a 4 °C con agitación suave durante 16 h; como control negativo se tomaron preparaciones incubadas sin anticuerpo primario y en las mismas condiciones. Se realizaron tres lavados idénticos a los anteriores, se añadió a las preparaciones el anticuerpo secundario biotinilado anti-IgG de conejo (BA-1000, Vector Laboratories, Inc.), diluido en la solución de lavado anterior, y se incubaron durante 1 h con agitación suave. Quince minutos antes de concluir la incubación con el anticuerpo secundario, se preparó el reactivo ABC del *VESTACTIN Elite ABC kit* (PK-6100, Vector Laboratories, Inc.) mezclando una gota del reactivo A con 2,5 mL de PBS, y luego añadiendo una gota del reactivo B. Las preparaciones se lavaron con PBS durante 5 min tres veces, se les añadió el reactivo ABC preparado y se incubaron durante 30 min en cámara húmeda. Posteriormente, se realizaron tres lavados de 5 min con PBS y el revelado se hizo incubando las preparaciones de 1-3 min con diaminobencidina (DAB) diluido 1:10 en su tampón correspondiente

(11718096001, Roche). La reacción colorimétrica se detuvo lavando las preparaciones con H<sub>2</sub>O destilada.

Una vez detectadas las proteínas de interés (en color marrón) y para visualizar los núcleos, se hizo una tinción con hematoxilina de Mayer. Para ello, las preparaciones se incubaron durante 15 s en una solución de este colorante (254766.1610, Panreac), se lavaron con H<sub>2</sub>O del grifo durante 5 min y de forma rápida con etanol al 95%. Finalmente, las muestras se deshidrataron de forma gradual, para lo cual se sumergieron en dos baños de etanol absoluto (2 × 3 min), y en dos baños de *Histo-Clear II* (HS-202, National Diagnostics) durante 3 min cada vez. El montaje de las preparaciones se realizó con cubreobjetos de vidrio y el medio *Histomount* (HS-103, National Diagnostics), y se dejaron secar durante un mínimo de 24 h. La visualización se realizó con el microscopio *Olympus Vanox AHB3*, y la captación de imágenes, con la cámara digital *Sony DXC-S500*.

## **5. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD GELATINASA**

### **5.1. Zimografía**

La zimografía o zimograma es una técnica electroforética que permite observar la actividad de proteasas contenidas en una muestra, sobre la base de la hidrólisis de su sustrato proteico presente en el gel. La electroforesis en condiciones nativas (sin detergentes ni agentes reductores) o semidesnaturalizantes (sin agentes reductores) y la posterior tinción con azul Coomassie, permiten identificar la proteasa en cuestión como una banda clara (zona con sustrato digerido) en un fondo azul.

Esta técnica se empleó en el estudio de la actividad gelatinasa de MMP-2 y MMP-9 presentes en el sobrenadante de CMLV, tanto a nivel basal como en células que sobre-expresaban NOR-1, Nurr1 o Nur77, y en presencia o ausencia del anticuerpo bloqueante de A2M (HPA002265, Sigma) o de una IgG inespecífica de conejo (sc-2763, Santa Cruz Biotechnology).

### **5.1.1. Preparación de las muestras**

Previo a la extracción de las muestras, las CMLV se cultivaron durante 48 h en medio de cultivo sin FBS ni suero humano. Una vez transcurrido este tiempo, el sobrenadante celular se centrifugó a  $290 \times g$  durante 20 min a temperatura ambiente para eliminar las células restantes y se dializó a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  con membranas de diálisis de tamaño de poro de 12-14 kDa (DTV12000.01.000, Medicell International Ltd.), en una solución de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  a 10 mM. Cada diálisis se hizo en un volumen de aproximadamente 200 veces el volumen de la muestra, hasta que se eliminó el rojo fenol del sobrenadante (24-48 h de diálisis con al menos tres cambios de solución). El contenido de la bolsa de diálisis se transfirió a un vial de 1,5 mL y se concentró al vacío a temperatura ambiente en el equipo *Concentrator plus* (Eppendorf) hasta la pérdida total de  $\text{H}_2\text{O}$ . El sedimento obtenido se resuspendió en tampón RIPA (composición en epígrafe 15) suplementado con CIP a 1X y se congeló a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

### **5.1.2. Electroforesis y actividad gelatinasa**

La electroforesis de proteínas se realizó en condiciones semidesnaturalizantes. Los geles se prepararon con un 10% de poliacrilamida en el gel separador, de forma similar a los de la técnica de *Western blot* (epígrafe 4.3) pero con gelatina A porcina (G1890, Sigma) a una concentración final de 1 mg/mL, previamente disuelta en el tampón Tris (pH 8,8). Las muestras se prepararon en tampón de carga no reductor (Tabla M16) y se calentaron a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 5 min. La electroforesis se realizó a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  y 100 V durante 2-4 h, con el tampón de recorrido Tris-glicina (epígrafe 4.3). Como marcador de peso molecular se empleó el *HyperPAGE Prestained Protein Marker* (BIO-33066, Bioline).

**Tabla M16. Composición del tampón de carga no reductor y la solución de activación.**

<b>TAMPÓN DE CARGA NO REDUCTOR</b>		<b>SOLUCIÓN DE ACTIVACIÓN</b>	
Tris-HCl (pH 6,8)	62,5 mM	Tris-HCl	50 mM
SDS	2 %	CaCl <sub>2</sub>	10 mM
Sacarosa	50 mg/mL	NaN <sub>3</sub>	0,02%
Azul de bromofenol	0,005 %	H <sub>2</sub> O desionizada	
H <sub>2</sub> O desionizada		Ajustar a pH 8	

Transcurrido este tiempo, se eliminó la región apiladora, el gel se lavó dos veces durante 15 min con una solución de Triton X-100 al 2,5%, se lavó brevemente con H<sub>2</sub>O destilada y se incubó en una solución de activación de la actividad gelatinasa (Tabla M16), a 37 °C durante 18-20 h. Posteriormente, el gel se tiñó durante 30 min con agitación a temperatura ambiente, en una solución de azul de Coomassie preparada a partir de una tableta *PhastGel™ Blue R* (17-0518-01, GE Healthcare Lifescience). El exceso de colorante se lavó varias veces con H<sub>2</sub>O hasta que se apreciaron las bandas claras en fondo azul, correspondientes a las gelatinasas. Finalmente, el gel se escaneó en un densitómetro *GS-800* (BIO-RAD) y la cuantificación relativa de las bandas se realizó mediante el *software Quantity-One* (BIO-RAD). La actividad gelatinasa se normalizó teniendo en cuenta el factor de concentración de la muestra, el volumen de muestra cargada en el gel y la concentración de proteínas totales o número de células correspondiente al sobrenadante inicial.

## 5.2. Detección de actividad gelatinasa total

El *EnzChek® Gelatinase/Collagenase Assay Kit* (Invitrogen) es un método de elevada sensibilidad que permite cuantificar de forma rápida la actividad gelatinasa total presente en una muestra. El sistema se basa en la degradación, por parte de las gelatinasas, de un sustrato conjugado de gelatina-fluoresceína (*DQ™ gelatin from pig skin, fluorescein conjugate*, D-12054, Molecular Probes), cuyos productos de digestión tienen una emisión máxima de fluorescencia a 515 nm y es proporcional a la actividad proteolítica.

Al igual que la zimografía, esta técnica se empleó en el estudio de la actividad gelatinasa de MMP-2 y MMP-9 en el sobrenadante de CMLV. Como el ensayo detecta actividad gelatinasa total, para determinar la actividad de cada metaloproteinasa por separado, fue necesario añadir a la muestra un inhibidor de MMP-2 (*ARP100*; sc-203522, Santa Cruz Biotechnologies) para determinar la actividad de MMP-9, o un inhibidor de MMP-9 (*MMP-9 inhibitor I*; sc-311437, Santa Cruz Biotechnologies) para la determinación de la actividad de MMP-2.

### 5.2.1. Preparación de las muestras

A partir de CMLV cultivadas en medio sin suero durante 48 h en condiciones óptimas, se recogió el sobrenadante celular, se centrifugó a  $290 \times g$  durante 20 min a temperatura ambiente para eliminar las células restantes y se dializaron a 4 °C con membranas de diálisis de tamaño de poro de 12-14 kDa (DTV12000.01.000, Medicell International Ltd.), en tampón de reacción (Tabla M17). Cada diálisis se hizo en un volumen de aproximadamente 250 veces el volumen de muestra, hasta que se eliminó el rojo fenol del sobrenadante (24-48 h de diálisis con al menos tres cambios de solución).

**Tabla M17. Composición del tampón de reacción.**

<b>COMPONENTES</b>	
Tris-HCl	50 mM
NaCl	150 mM
CaCl <sub>2</sub>	5 mM
NaN <sub>3</sub>	0,2 mM
H <sub>2</sub> O desionizada	
Ajustar a pH 7,6	

Se recuperó el contenido de la bolsa de diálisis, se ajustó el volumen de cada muestra a un mismo valor y se guardaron a -80 °C hasta su uso.

### 5.2.2. Ensayo enzimático

La reacción enzimática se realizó en un volumen final de 200 µL, en placas de 96 pocillos (de paredes blancas y fondo redondo), durante 24 h a

temperatura ambiente y protegida de la luz. Para ello, se mezcló en el tampón de reacción (Tabla M18) 100  $\mu$ L de muestra con el sustrato conjugado a 100  $\mu$ g/mL y, según el caso, con el inhibidor *ARP100* a 50 nM o con el *MMP-9 inhibitor I* a 100 nM. La detección de fluorescencia a 515 nm se realizó en el equipo *Spectra Max Gemini EM* (Molecular Devices). Cada medición fue corregida restando la lectura del blanco (mezcla con tampón de reacción en lugar de muestra) para cada condición experimental.

## **6. ANÁLISIS *IN SILICO* DE SECUENCIAS**

Las secuencias de ADN analizadas se obtuvieron a partir de la base de datos generada por el proyecto *Ensembl* ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)). El análisis de las regiones promotoras de los genes de interés se realizó mediante la herramienta *MatInspector* ([www.genomatix.de](http://www.genomatix.de)) que, entre sus aplicaciones, permite identificar posibles elementos de respuesta en una secuencia de ADN utilizando una amplia librería de descriptores de sitios de unión a factores de transcripción. Por su parte, los alineamientos múltiples de secuencias se realizaron usando la herramienta *Clustal Omega* ([www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk)).

## **7. CLONACIÓN Y OBTENCIÓN DE ADN PLASMÍDICO**

Mediante esta estrategia se obtuvieron diferentes construcciones plasmídicas tanto para estudios de actividad transcripcional (epígrafe 8, realizadas en el vector reportero pGL3) como para la sobre-expresión estable de genes de interés (epígrafe 10, realizadas en el vector de expresión lentiviral pLVX).

### **7.1. Electroforesis de ADN**

Esta técnica se empleó para separar, identificar y purificar fragmentos de ADN a partir de una reacción de PCR o de digestión enzimática. Para ello, se prepararon geles de agarosa (Agarosa estándar de baja electroendosmosis, Ecogen) al 0,8-1,2% (dependiendo del tamaño de los fragmentos a separar), con bromuro de etidio a 0,5 mg/mL, en tampón TAE (ver composición en epígrafe 15). La muestra se mezcló con tampón de carga 6X (glicerol al 30%, bromofenol azul a 2,5 mg/mL) y la electroforesis se realizó a 80 V. Como marcador de peso molecular se empleó el *GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder* (Fermentas) o el *100 pb DNA Ladder* (New England BioLabs) dependiendo del tamaño del fragmento amplificado. La visualización de las bandas se realizó mediante la exposición del gel a luz ultravioleta.

### **7.2. Obtención del inserto**

El inserto o fragmento a clonar se obtuvo de dos maneras, según el caso: por amplificación mediante PCR o por digestión enzimática.

#### **7.2.1. Obtención por PCR**

Se realizó a partir de 50 µg de ADN genómico o 2 ng de ADN plasmídico como molde, con la polimerasa de alta fidelidad *Pfu DNA polymerase* (Fermentas) y oligonucleótidos cebadores que contenían las dianas de restricción para su posterior inserción en el vector receptor, diseñados mediante la herramienta *NCBI/Primer-BLAST* a partir de secuencias obtenidas de la base de datos generada por el proyecto *Ensembl* ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 50 µL y se ajustó para cada caso la concentración de MgSO<sub>4</sub>, la temperatura de hibridación de los cebadores al molde y el tiempo de elongación para obtener el amplicón (producto) deseado. Los componentes y condiciones de reacción se indican en la Tabla M18.

Para comprobar la amplificación del fragmento de interés, se hizo una electroforesis de ADN (epígrafe 7.1) con 5 µL de la reacción de PCR. Una vez se identificó el producto amplificado, se hizo una nueva electroforesis de

ADN con el volumen restante de la reacción de PCR y el fragmento de interés se purificó a partir del gel mediante el *QIAquick Gel Extraction kit* (Qiagen).

**Tabla M18. Composición y condiciones de las reacciones PCR.**

<b>COMPOSICIÓN</b>		<b>CONDICIONES</b>	
ADN (genómico o plasmídico)	50 µg o 2 ng	95 °C	5 min
<i>Pfu buffer 10X</i> (Fermentas)	1X	95 °C	45 s
MgSO <sub>4</sub> (Fermentas)	1-2 mM	58-64 °C	45 s 30 veces
DMSO (Bioline)	3%	72 °C	2 min/kb
<i>dNTPs</i> (Roche)	0,2 mM	72 °C	7 min
Oligonucleótido <i>Forward</i>	0,4 µM		
Oligonucleótido <i>Reverse</i>	0,4 µM		
<i>Pfu DNA polymerase</i>	1,25 U		
H <sub>2</sub> O desionizada libre de nucleasas			

El inserto purificado fue digerido con las enzimas de restricción según las dianas introducidas en la reacción de PCR. Las digestiones con dos enzimas (digestión doble) se realizaron en un volumen final de 20-40 µL, a partir de 0,5-1,0 µg del fragmento purificado y según la actividad de ambas enzimas en un mismo tampón de reacción, determinada por la herramienta *DoubleDigest Calculator* ([www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)). Las reacciones se incubaron a 37 °C durante 1-2 h y el fragmento digerido se purificó mediante el *QIAquick PCR Purification kit* (Qiagen).

### 7.2.2. Obtención por digestión enzimática

Se realizó a partir de 1-3 µg de ADN plasmídico, según el tamaño del fragmento de interés. Para las digestiones con una enzima se siguieron las recomendaciones del fabricante, pero para las digestiones dobles las condiciones de reacción se determinaron con la herramienta *DoubleDigest Calculator* como se describió anteriormente. La obtención del fragmento de interés se comprobó mediante electroforesis de ADN (ver epígrafe 7.1.) y se purificó a partir del gel de agarosa con el *QIAquick Gel Extraction kit* (Qiagen).

### 7.3. Digestión del vector receptor y ligación

El vector receptor fue digerido en las mismas condiciones que su inserto correspondiente. En este caso, las reacciones se realizaron a partir de 1-3 µg de vector y la obtención del plásmido digerido se hizo mediante electroforesis de ADN (ver epígrafe 7.1) y purificación a partir del gel de agarosa con el *QIAquick Gel Extraction kit* (Qiagen). En el caso de los vectores digeridos con una única enzima, posterior a la reacción de digestión fue necesario desfosforilar los extremos 5'-fosfato para minimizar el riesgo de religación del vector. Para ello se utilizó la fosfatasa alcalina *CIAP* (*Calf Intestinal Alkaline Phosphatase*; Invitrogen) según las recomendaciones del fabricante.

Previo a la ligación, se determinó la concentración tanto del vector receptor como del inserto a clonar (ambos digeridos) mediante el espectrofotómetro *NanoDrop* (Thermo Scientific). La reacción de ligación se realizó con la enzima *T4 DNA Ligase* (Fermentas) con una proporción molar inserto:vector (M) de 3. Para ello, en un volumen final de 15 µL se mezclaron 1 U de enzima, el tampón de reacción correspondiente (Fermentas), 25-40 ng de vector y la cantidad de inserto determinada según la ecuación:

$$\text{Cantidad de inserto [ng]} = \frac{\text{Cantidad de vector [ng]} \times \text{Tamaño del inserto [kb]} \times M}{\text{Tamaño del vector [kb]}}$$

Las reacciones se incubaron 1 h a 22 °C y luego a 16 °C durante 16 h.

### 7.4. Transformación bacteriana y obtención de ADN plasmídico

La transformación bacteriana es un proceso que permite introducir ADN plasmídico en una bacteria (por lo general *Escherichia coli*) y utilizarla para producir plásmido. Un gen de resistencia a un antibiótico determinado (marcador de selección) permite seleccionar las bacterias que han incorporado el plásmido de las que no, en un medio de cultivo suplementado con dicho antibiótico.

Esta técnica se usó para obtener ADN plasmídico para su análisis y otros usos. En este caso, todos los plásmidos y construcciones contienen un gen de resistencia a ampicilina como marcador de selección en bacterias, y la concentración final de ampicilina (A9518, Sigma) en el medio de cultivo (líquido y sólido) fue 100 µg/mL. A menos que se indique lo contrario, la incubación de los cultivos bacterianos en medio líquido se realizó a 37 °C con agitación orbital (220 rpm) en el equipo *Orbital Shaker* (ThermoForma), mientras que los cultivos en medio sólido (placa LB-agar) se incubaron a esta misma temperatura en un incubador (Sheldon Manufacturing, Inc.).

#### 7.4.1. Preparación de bacterias competentes

La preparación de las bacterias competentes se realizó como fue descrito por Hanahan en 1985,<sup>253</sup> y se emplearon bacterias *E. coli* de la cepa DH5α. Para ello se inoculó 10 µL de una reserva de bacterias (congelada a -80 °C en medio LB con 20% de glicerol) en un tubo estéril de 50 mL que contenía 10 mL de medio *Luria Bertani* (LB, Tabla M19), y se incubó durante 16 h.

**Tabla M19. Medios de cultivo LB, SOB, RF1 y RF2.**

<b>COMPONENTES</b>	<b>LB</b>	<b>SOB</b>	<b>COMPONENTES</b>	<b>RF1</b>	<b>RF2</b>
Bacto Triptona	10 g/L	20 g/L	RbCl	100 mM	10 mM
Extracto de levadura	5 g/L	5 g/L	MnCl <sub>2</sub>	50 mM	-
NaCl	86 mM	10 mM	Acetato de potasio	30 mM	-
KCl	-	2,4 mM	CaCl <sub>2</sub>	10 mM	75 mM
MgCl <sub>2</sub>	-	10 mM	Glicerol	12%	12%
NaOH	1 mM	-	MOPS	-	10 mM
H <sub>2</sub> O desionizada			H <sub>2</sub> O desionizada		

Transcurrido este tiempo, se añadieron 2 mL de este cultivo saturado en un *Erlenmeyer* que contenía 50 mL de medio *Super Optimal Broth* (SOB, Tabla M19) suplementado con MgSO<sub>4</sub> a 10 mM, y se incubó en las mismas condiciones anteriores hasta que el cultivo alcanzó valores de densidad óptica entre 0,4 y 0,6. Estos valores se determinaron por la absorbancia del cultivo a 630 nm. Posteriormente, el cultivo se transfirió a un tubo de 50 mL estéril, se dejó enfriar en hielo durante 10-15 min y se centrifugó a 4 °C y 1.000 × g durante 12 min. El sedimento bacteriano obtenido se resuspendió

en 16 mL de solución RF1 (Tabla M19), se incubó en hielo durante 15 min y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones anteriores. Finalmente, el precipitado se resuspendió en 4 mL de solución RF2 (Tabla M19), se incubó en hielo durante 15 min y la suspensión bacteriana se guardó a -80 °C hasta su uso, en alícuotas de 200 µL.

### 7.4.2. Transformación

La transformación de las bacterias se realizó por choque térmico a 42 °C. Para ello, se descongeló en hielo una alícuota de 200 µL de bacterias competentes (obtenida como se describe en el epígrafe anterior), se le añadió el ADN a transformar (5 µL de reacción de ligación o 1 ng de plásmido) y la mezcla se incubó en hielo durante 20 min. Transcurrido este tiempo, las bacterias se incubaron durante 1 min a 42 °C, se mantuvieron 5 min en hielo, se mezclaron con 800 µL de medio SOB suplementado con 20 mM de glucosa, y se incubaron durante 1 h. Finalmente, la suspensión bacteriana se centrifugó a temperatura ambiente a 1.000 × g durante 1 min, el sedimento se resuspendió en 100 µL de medio LB y se sembró en placas de LB-agar (medio LB con agar al 1,5%) con ampicilina, que se incubaron durante 16 h. Una vez aparecieron las colonias de bacterias resistentes al antibiótico, las placas se guardaron a 4 °C.

La transformación bacteriana con ADN plasmídico procedente de una reacción de mutagénesis (epígrafe 8.1.2) se realizó igualmente por choque térmico a 42 °C, pero utilizando las bacterias competentes (*XL10-Gold<sup>®</sup> ultracompetent cells*) del kit de mutagénesis. Para ello, se descongeló en hielo una alícuota de 45 µL de estas células, se le añadió 2 µL de una solución de β-mercaptoetanol (*XL10-Gold<sup>®</sup> β-mercaptoethanol mix*) del kit y se incubó en hielo durante 2 min. Acto seguido, se añadió 2 µL de la reacción de mutagénesis, la mezcla se incubó en hielo durante 30 min y se sometió a un choque térmico de 30 s a 42 °C, seguido de 2 min en hielo. Las bacterias se mezclaron con 500 µL de medio SOB suplementado con 20 mM de glucosa y se incubaron durante 1 h. La siembra en placas de LB-agar de la

suspensión resultante se hizo de forma similar al realizado con las bacterias DH5 $\alpha$ , descrita anteriormente.

### 7.4.3. Selección de clones y obtención de ADN plasmídico libre de endotoxinas

El análisis del ADN procedente de una colonia de bacterias (clon) permitió seleccionar aquéllas que contienen el plásmido o la construcción de interés. Para ello, un cultivo de 3 mL de LB suplementado con ampicilina fue inoculado con una colonia aislada proveniente de la placa de LB-agar sembrada en la transformación, y se incubó durante 16 h. A partir de 2 mL del cultivo se extrajo el ADN plasmídico mediante el *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen), y se cuantificó con el espectrofotómetro *NanoDrop* (Thermo Scientific). El resto del cultivo se guardó a 4 °C.

El ADN obtenido de cada clon se analizó por digestión con enzimas de restricción específicas o mediante secuenciación. Entre 100 y 500 ng de ADN plasmídico se digirieron con 5 U de enzima (Fermentas) para liberar el fragmento insertado y verificar la orientación del inserto. La separación de los productos de la digestión enzimática se realizó mediante electroforesis de ADN en gel de agarosa al 0,8-1,5% (dependiendo del tamaño de los fragmentos a separar), tal y como se describe en el epígrafe 7.1. El servicio de secuenciación, tanto de las construcciones obtenidas por ligación como las obtenidas por mutagénesis, lo realizó la empresa *StabVida* ([www.stabvida.com](http://www.stabvida.com)).

Una vez identificados los clones correctos, se hizo una siembra en estría en placas de LB-agar con ampicilina que se incubaron durante 16 h. A partir de una colonia aislada obtenida de esta siembra, se inoculó un cultivo líquido de 3 mL de LB con ampicilina y se incubó durante 8-10 h. Acto seguido, se añadió 100  $\mu$ L del cultivo crecido a un *Erlenmeyer* de 500 mL que contenía 100 mL de medio LB con ampicilina, y se incubó durante 16 h. A partir del nuevo cultivo, se preparó un 1 mL de glicerolado (80% medio de cultivo / 20% glicerol) que se guardó a -80 °C, y el resto se centrifugó a 3.200  $\times$  g y 4 °C durante 15 min. A partir del sedimento bacteriano obtenido, se extrajo el

ADN plasmídico libre de endotoxinas mediante el *QIAfilter Plasmid Midi Endotoxin Free Kit* (Qiagen).

### **8. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL**

Esta técnica permitió identificar y determinar la funcionalidad de elementos de respuesta NBRE presentes en un fragmento de promotor concreto, clonado en el vector reportero pGL3. Para ello se co-transfectaron cultivos celulares con dichas construcciones y un vector de expresión de NOR-1.

#### **8.1. Obtención de las construcciones en el vector reportero**

El vector reportero pGL3 (*pGL3-basic*, Promega) contiene el ADNc que codifica para una forma modificada de la enzima luciferasa de la luciérnaga *Photinus pyralis* (*luc<sup>+</sup>*). Hacia el extremo 5' de *luc<sup>+</sup>* contiene una región MCS (Multi Cloning Site) con dianas de restricción que permiten la inserción de un fragmento de promotor a evaluar, de modo que la expresión de la luciferasa dependerá de la funcionalidad del fragmento clonado. Este vector además contiene la secuencia de origen de replicación en *E. coli* y un gen de resistencia a ampicilina, que permiten la selección de las bacterias que han incorporado el plásmido (ver epígrafe 7.4.2).

Las diferentes construcciones en este vector reportero se obtuvieron por la inserción del fragmento de promotor de interés en el pGL3 (clonación) o mediante mutagénesis dirigida a partir de una construcción ya existente.

##### **8.1.1. Obtención por clonación**

Las construcciones de los promotores de los genes MYOM1, PROS1, ABLIM1, MYL4 y A2M(ratón) se obtuvieron por la inserción en el vector pGL3 de un fragmento del promotor correspondiente obtenido por PCR (ver epígrafe 7.2.1).

La Tabla M20 muestra los oligonucleótidos empleados en cada reacción de PCR, las dianas de restricción incorporadas (se subraya) y la posición del fragmento de promotor clonado respecto al inicio de transcripción (para MYOM1) o respecto al inicio de traducción (para PROS1, ABLIM1, MYL4 y A2M[ratón]).

**Tabla M20. Oligonucleótidos para la obtención por PCR de los fragmentos de promotores.**

<b>GEN/FRAGMENTO</b>	<b>UBICACIÓN</b>	<b>OLIGONUCLEÓTIDO (SECUENCIA 5'-3')</b>	<b>DIANA</b>
<b>MYOM1</b>			
pMYOM1-1919	-1829/+94	ACACTTGGAAAACCTGCCTATGGCT TT <u>GCTAGCCGAGGAGCTGGATGAGA</u>	- <i>NheI</i>
pMYOM1-808	-712/+94	TT <u>GGTACCCAACCGGTTACACCTCCTC</u> TT <u>GCTAGCCGAGGAGCTGGATGAGA</u>	<i>KpnI</i> <i>NheI</i>
<b>PROS1</b>			
pPROS1-1971	-2210/-240	CAGGTAC <u>CAGCTGGGGCACAATTCTCAA</u> TT <u>GCTAGCGGGATGGGCTCTAGTGTGG</u>	<i>KpnI</i> <i>NheI</i>
<b>ABLIM1</b>			
pABLIM1-1902	-1896/+8	TAGAGCTCCCACTTTCCCAAGTCCACC CAG <u>CTAGCAGGCATCTTGGCATGGA</u>	<i>SacI</i> <i>NheI</i>
<b>MYL4</b>			
pMYL4-1966	-2298/-337	TTGCTAGCCACCATCCAGCTCAGGAC TT <u>CTCGAGCCGGAGCAGCCAGAGAGATGA</u>	<i>NheI</i> <i>XhoI</i>
pMYL4-386	-729/-337	AGCCGCTAGCTAGGCATGGGTTCACTGCT TT <u>CTCGAGCCGGAGCAGCCAGAGAGATGA</u>	<i>NheI</i> <i>XhoI</i>
<b>A2M(ratón)</b>			
pA2M-2004	-2089/-86	TTGGTACCTGGAATGATCCTTTCTTGGGACT AT <u>GCTAGCGCTTTATGCAAACAGCGGGT</u>	<i>KpnI</i> <i>NheI</i>

Para obtener los fragmentos pMYOM1-1919, pPROS1-1971, pABLIM1-1902 y pMYL4-1966 se tomó como molde ADN genómico humano, mientras que para el fragmento pA2M-2004 se empleó ADN genómico de ratón. El fragmento pMYOM1-1919 se digirió además con *KpnI*, aprovechando la diana interna presente en el producto amplificado. Para la obtención de los fragmentos pMYOM1-808 y pMYL4-386 se tomó como molde ADN plasmídico de la construcción mayor correspondiente.

Se obtuvieron las construcciones pGL3/pMYOM1-1919, pGL3/pMYOM1-808, pGL3/pPROS1-1971, pGL3/pABLIM1-1902, pGL3/pMYL4-1966, pGL3/pMYL4-386 y pGL3/pA2M-2004.

El estudio de la actividad transcripcional del promotor de SMPX se realizó con las construcciones pGL3/pSMPX-2260, pGL3/pSMPX-354, pGL3/pSMPX-153 (que contienen los fragmentos comprendidos entre las posiciones -2260/+64, -354/+64, y -143/+64, respectivamente a partir del inicio de transcripción) y pGL3/pSMPX-354NBREmut (obtenida a partir de pGL3/pSMPX-354 con el elemento NBRE(-167/-160) mutagenizado).

### 8.1.2. Mutagénesis dirigida

Esta técnica permite obtener mutaciones puntuales en sitios específicos del ADN. En nuestro caso las mutaciones consistieron en sustituciones de nucleótidos concretos, introducidas por PCR con oligonucleótidos cebadores que contienen la mutación.

Las reacciones de mutagénesis se realizaron empleando el *QuikChange™ II Site-Directed Mutagenesis Kit* (Agilent Technologies, Inc), 25 µg de ADN plasmídico a mutar (pGL3/pMYOM1-1919) y las condiciones que se indican en la tabla M21. Para ello, se diseñaron oligos específicos (Tabla M21) mediante la herramienta *QuikChange Primer Design Program* ([www.genomics.agilent.com](http://www.genomics.agilent.com)); se subraya la secuencia del elemento NBRE y se indican en minúsculas las bases mutadas. Se obtuvo la construcción pGL3/pMYOM1-1919mut.

**Tabla M21. Condiciones de reacción y oligonucleótidos para la mutagénesis.**

<b>CONDICIONES DE REACCIÓN</b>		
95 °C	2 min	
95 °C	20 s	
60 °C	10 s	18 veces
68 °C	3,5 min	
68 °C	5 min	
37 °C	1 min	
<b>OLIGONUCLEÓTIPO: SECUENCIA (5' - 3')</b>		
Hs-pMYOM1-NBREmut-sentido:		
GAAAAACAATTTTGATAGACACAGG <u>GTTC</u> TTTATTCAGTTGATGTAATATCACTG		
Hs-pMYOM1-NBREmut-anti-sentido:		
CAGTGATATTACATCAACTGAATAAA <u>GaaCACCT</u> GTGTCTATCAAAATTGTTTTTC		

## **8.2. Transfecciones transitorias**

Estos procedimientos permitieron la introducción de las construcciones obtenidas en pGL3 con los fragmentos de promotores de los genes de interés y el vector de expresión de NOR-1, en cultivos de CMLV de rata y de la línea celular NIH/3T3. En este caso se usó como vehículo la *Lipofectamine*<sup>®</sup> *LTX Reagent* (Invitrogen) combinado con el *PLUS*<sup>TM</sup> *Reagent*, de la misma casa comercial. En cada mezcla de transfección fue añadido el vector reportero de actividad *Renilla* (actividad luciferasa de *Renilla reniformes*) pRL-SV40 (Promega), como control de la eficiencia de transfección.

Las células (CMLV o NIH/3T3) se sembraron en placas de 12 pocillos (80.000 células/pocillo) en medio completo sin antibióticos (epígrafe 2.2) y se incubaron durante 24 h en condiciones óptimas de crecimiento. Para la transfección se preparó por pocillo una mezcla que contenía 500 ng de la construcción en pGL3, 50 ng del vector de expresión de NOR-1 (pCMV5/NOR-1-FLAG) o del vector vacío pCMV5, 20 ng del vector pRL-SV40 y 0,5 µL de *PLUS*<sup>TM</sup> *Reagent* en 100 µL de *OptiMEMI* (Gibco). La mezcla se incubó durante 10 min a temperatura ambiente, se le añadió 1,25 µL de *Lipofectamine*<sup>®</sup> *LTX Reagent* y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. El medio de cultivo de las células se reemplazó por medio de cultivo sin antibióticos, se añadió a cada pocillo la mezcla de transfección preparada, según correspondía, y las células se incubaron durante 16 h en condiciones óptimas. Pasado este tiempo, el medio de transfección se sustituyó por medio completo sin antibióticos y se incubaron durante 8-10 h.

## **8.3. Determinación de la actividad luciferasa**

La determinación de la actividad luciferasa se realizó mediante el *Dual-Luciferase*<sup>®</sup> *Reporter Assay System* (Promega), que permite determinar la actividad luciferasa de luciérnaga y *Renilla* de forma simultánea. Para ello, una vez transcurridas las 8-10 h de incubación, las células se lavaron con PBS y a cada pocillo se añadió 80-100 µL del tampón *PLB* (*Passive Lysis Buffer*) del

kit. Se recogió el lisado celular mediante raspado y se congeló a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para optimizar la lisis.

Para la lectura de luminiscencia, se descongelaron los lisados celulares y se centrifugaron a temperatura ambiente durante 1 min a  $16.000 \times g$ . De cada sobrenadante obtenido se cargó 10  $\mu\text{L}$ /pocillo en una placa de 96 pocillos (Nunc), y se introdujo en el luminómetro *Orion I* (Berthold Detection Systems). La lectura de luminiscencia se realizó como indica el protocolo del proveedor. El luminómetro dispensó a cada pocillo 50  $\mu\text{L}$  de *LAR II* (*Luciferase Assay Reagent II*) y 50  $\mu\text{L}$  de *Stop & Glo<sup>®</sup> Reagent*, en este orden. Los valores de actividad luciferasa de cada muestra se expresó por el cociente: actividad luciferasa de luciérnaga / actividad *Renilla*.

## **9. ENSAYOS DE UNIÓN PROTEÍNA-ADN**

### **9.1. Ensayo de retardo de la movilidad electroforética (EMSA)**

El EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*) permite analizar la capacidad de unión de proteínas a un fragmento de ADN marcado radioactivamente (sonda) y se basa en la diferencia de movilidad electroforética de los diferentes complejos ADN/proteína formados, con relación a la sonda libre.

Esta técnica se empleó para analizar la unión de proteínas nucleares de CMLV transducidas con lentivirus (epígrafe 10.1.2), a sondas específicas. Para ello, las células se sembraron en placas de 100 mm ( $55\text{ cm}^2$ ) a razón de  $10^6$  células/placa y, una vez finalizado el procedimiento de transducción, se extrajeron las proteínas nucleares (epígrafe 4.1.4).

#### **9.1.1. Preparación de la sonda**

Mediante la herramienta *NCBI/Primer-BLAST*, se diseñó la sonda de ADN de doble cadena 5'-CACAGGTGACCTTTATTCAG-3' (Hs-MYOM1-EMSA-NBRE), correspondiente al fragmento del promotor de *MYOM1*, que contiene el elemento de respuesta NBRE en una posición centrada de la secuencia, y se

diseñó además la variante con este elemento mutado 5'-CACAGGTGttCTTTATTTCAG-3' (Hs-MYOM1-EMSA-NBREmut). En ambos casos se subraya la secuencia del elemento NBRE y se indican en minúsculas las bases cambiadas en la sonda mutada.

En primer lugar, se realizó el marcaje radiactivo de cada sonda con [<sup>32</sup>P]γ-ATP (Perkin Elmer). La sonda de doble cadena se generó por hibridación de los oligonucleóticos complementarios correspondientes en un volumen total de 100 μL donde se mezcló 5 μg de cada oligonucleótido en tampón TE (composición en epígrafe 15) con NaCl a 150 mM y se incubó a 100 °C durante 5 min. La mezcla se dejó enfriar hasta temperatura ambiente durante 16 h y se comprobó la formación de la doble hebra mediante electroforesis a 100 V durante 1 h, en un gel de poliacrilamida al 20% (Tabla M22) con TBE como tampón de recorrido (composición en epígrafe 15). El marcaje se realizó en un volumen final de 20 μL mezclando 100 ng de sonda hibridada, 30 μCi de [<sup>32</sup>P]γ-ATP, 5 U de la enzima T4 polinucleótido quinasa (*T4pNK*, Fermentas) y su tampón de reacción correspondiente. La mezcla se incubó durante 1 h a 37 °C, se añadió 80 μl de TE para detener la reacción y las sondas marcadas se purificaron con columnas de *Sephadex G-50* (GE Healthcare). Las sondas se eluyeron con tampón TE y la radiactividad incorporada se estimó por contaje en líquido de centelleo (Biogreen) en un contador (Beckman Coulter LS 6500).

**Tabla M22. Geles de poliacrilamida al 20 y al 5%.**

<b>COMPONENTES</b>	<b>20%</b>	<b>5%</b>
Acrilamida/bis-acrilamida al 30% (A3699, Sigma)	6,6 mL	6,6 mL
TBE 10X	1 mL	2 mL
Glicerol al 80%	-	2,5 mL
Persulfato de amonio al 20%	37,5 μL	121,5 μL
TEMED (T9281, Sigma)	5 μL	32 μL
H <sub>2</sub> O desionizada	2,7 mL	28,84 mL

### 9.1.2. Electroforesis y detección de los complejos ADN/proteína

Previamente se preparó un gel de poliacrilamida al 5% (Tabla M22), cuya mezcla se desgasificó bajo vacío antes de añadir el TEMED. Una vez polimerizado y antes de aplicar las muestras, el gel fue corrido en TBE 0,3X durante 1 h a 190 V y 4 °C.

En la preparación de las muestras se utilizaron los reactivos del *EMSA Accesory kit* (Novagen). Para ello, en un volumen final de 20 µL se mezclaron 5 µg de proteínas nucleares, tampón de unión, DTT a 0,5 mM y 0,01 U de poly-d[I-C], y se incubaron durante 10 min a 4 °C. En las muestras de los ensayos de competición y de super-retardación se añadió 1 µL de la sonda no marcada (sonda “fría”, sin marcar) o 2 µg del anticuerpo anti-FLAG (F1804-200UG, Sigma), respectivamente y se incubaron durante otros 15 min a 4 °C. A todas las muestras se añadió aproximadamente 100.000 cpm de la sonda marcada radiactivamente, se incubaron durante 15 min a 4 °C y se aplicaron en el gel de poliacrilamida al 5%. Los complejos ADN-proteína se separaron mediante electroforesis a 190 V durante aproximadamente 2-3 h a 4 °C, en tampón TBE 0,3X con β-mercaptoetanol (140,8 µL/L de TBE 0,3X). El gel se transfirió bajo vacío a un papel *Whatman* de 3 mm (GE Healthcare Life Sciences), se secó y se expuso a una película autorradiográfica (*CURIX RP2 Plus X-ray films*; AGFA) con pantalla amplificadora. Después de 24 h a -80 °C, las películas se revelaron por procedimientos fotográficos estándares empleando las soluciones reveladora (G153) y fijadora (G354) de la misma casa. Las películas se escanearon en un densitómetro *GS-800* (BIO-RAD) y la cuantificación relativa de las bandas se realizó mediante el *software Quantity-One* (BIO-RAD).

### 9.2. Inmunoprecipitación de cromatina (*ChIP*)

El ensayo de ChIP (*Chromatin Immunoprecipitation*) permite detectar *in vivo* la unión de un determinado factor de transcripción a un elemento de respuesta concreto dentro de un promotor. La inmunoprecipitación de los complejos ADN/proteína con un anticuerpo específico y la posterior

amplificación por RT-PCR de estos fragmentos, permiten cuantificar el incremento de la unión del factor de transcripción al ADN para cada condición experimental.

En nuestro estudio se utilizó esta metodología para evaluar la unión de los receptores de la familia NR4A a los elementos NBRE de los promotores de MYOM1, A2M y SMPX en CMLV humanas transducidas con lentivirus (epígrafe 10.3), y en HSMM transfectadas con RNA de interferencia (epígrafe 12). Para ello, las células se sembraron en placas de 100 mm a razón de  $10^6$  células/placa.

### 9.2.1. *Cross-link*, lisis y fragmentación de la cromatina

Una vez realizados los procedimientos de transducción y transfección, las células se fijaron (*cross-link*) con formaldehído (añadido a las placas sin retirar el medio de cultivo) a una concentración final del 1%, durante 10 min a temperatura ambiente, lo que permitió la conservación de las interacciones ADN-proteína. Acto seguido, se añadió glicina hasta una concentración final de 125 mM (para detener el *cross-link*) y se incubó durante 5 min. Se eliminó el medio de cultivo, las células se lavaron dos veces durante 5 min con PBS frío, y se recuperaron en PBS frío suplementado con CIP, con ayuda de un raspador y sobre hielo. Cada suspensión celular se centrifugó a  $1.350 \times g$  y  $4^\circ C$  durante 5 min. El precipitado obtenido se resuspendió en 500  $\mu L$  de tampón LB1 (Tabla M23), se incubó 10 min en hielo y se centrifugó en las condiciones anteriores. Para eliminar los detergentes, se descartó el sobrenadante y el nuevo precipitado se resuspendió en 500  $\mu L$  de tampón LB2 (Tabla M23), se incubó a  $4^\circ C$  con agitación orbital suave durante 10 min y se centrifugó de igual manera a la anterior. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado obtenido (cromatina) se resuspendió en 300  $\mu L$  de tampón LB3 (Tabla M23).

**Tabla M23. Composición de los tampones de lisis de la técnica de *ChIP*.**

<b>COMPONENTES</b>	<b>LB1</b>	<b>LB2</b>	<b>LB3</b>
Tris	-	10 mM	10 mM
HEPES	50 mM	-	-
NaCl	140 mM	200 mM	100 mM
EDTA	1 mM	1 mM	1 mM
Glicerol	10%	-	-
Nonidet P-40	0,5%	-	-
Triton X-100	0,25%	-	-
EGTA	-	0,5%	0,5%
Desoxicolato de sodio	-	-	0,1%
N-lauroilsarcosina de sodio	-	-	0,5%
CIP	1X	1X	1X
H <sub>2</sub> O desionizada			

La cromatina se fragmentó por sonicación a 4 °C e intensidad media en el sonicador *Bioruptor® Plus UCD-300* (Diagenode), hasta conseguir fragmentos de ADN de 500-1000 pb. Las condiciones de sonicación fueron previamente optimizadas según el tipo celular: para las CMLV se hicieron tres ciclos de 15 min, cada uno de los cuales alterna 30 s en marcha con 45 s en reposo (30 s *ON* / 45 s *OFF*), mientras que para las HSMM se realizaron tres ciclos de 5 min (30 s *ON* / 30 s *OFF*). Una vez fragmentada la cromatina, a las muestras se les añadió Triton X-100 hasta 1% de concentración final, se agitaron con vórtex, se centrifugaron a 16.000 × g y 4 °C durante 10 min, y se recuperó el sobrenadante (cromatina fragmentada).

### 9.2.2. Inmunoprecipitación y elución de los complejos ADN/proteína

El paso siguiente consistió en lavar la cromatina fragmentada con bolas de agarosa acopladas a proteína A/G (sc-2003, Santa Cruz Biotechnology). Este paso pretende eliminar interacciones inespecíficas, previo a la inmunoprecipitación. Para ello, 50 µL de suspensión de bolas se mezcló con 1 mL de PBS a temperatura ambiente y se centrifugó a 1.000 × g durante 1 min (este paso se realizó tres veces). El sedimento final de bolas se resuspendió en 900 µL de tampón de dilución frío (Tabla M24), se le añadió 100 µL de cromatina fragmentada y se incubó a 4 °C con agitación orbital

suave durante 30 min. Las muestras se centrifugaron a 4 °C y 1.000 × g durante 1 min, y se recogió el sobrenadante, del cual se separó 20 µL (5% del volumen total) como referencia de la cantidad de material de partida (*Input*). La inmunoprecipitación de los complejos ADN/proteína del volumen restante se realizó añadiendo 5 µg de anticuerpo anti-FLAG (F1804-200UG, Sigma) a las muestras de CMLV, 5 µg de anticuerpo anti-NOR-1 (sc-22519, Santa Cruz Biotechnology) a las muestras de HSMM, o la misma cantidad de IgG inespecífica de ratón (sc-2025, Santa Cruz Biotechnology) o IgG inespecífica de conejo (sc-2763, Santa Cruz Biotechnology) como control negativo, según el caso. Las mezclas se incubaron a 4 °C con rotación orbital suave durante 16 h, se les añadió 50 µL de suspensión de bolas lavadas como se describió anteriormente, se incubaron durante 1 h (para permitir la unión de las bolas de agarosa al anticuerpo añadido), se centrifugaron a 4 °C y 1.000 × g durante 1 min y se descartó el sobrenadante. El precipitado que contenía los complejos ADN/proteína/anticuerpo acoplados a las bolas de agarosa se lavó sucesivamente durante 5 min con agitación orbital suave con 1 mL de los tampones A, B, C (Tabla M24) y TE (composición en epígrafe 15), en ese orden. Después de cada lavado, las muestras se centrifugaron a 4 °C y 1.000 × g durante 1 min, y se descartó el sobrenadante.

**Tabla M24. Composición de los tampones de dilución y de lavado.**

<b>COMPONENTES</b>	<b>Dilución</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>
Tris	16,7 mM	20 mM	20 mM	10 mM
NaCl	167 mM	150 mM	500 mM	-
LiCl	-	-	-	250 mM
EDTA	1,2 mM	2 mM	2 mM	1 mM
SDS	0,01%	0,1%	0,1%	-
Triton X-100	1,1%	1%	1%	-
Nonidet P-40	-	-	-	1%
Desoxicolato de sodio	-	-	-	1%
CIP	1X	-	-	1X
H <sub>2</sub> O desionizada				

Después del último lavado el precipitado obtenido se resuspendió en 100 µL de tampón de elución (SDS al 1% y NaHCO<sub>3</sub> a 100 mM, en TE). Las muestras reservadas como *Input* se llevaron a este volumen final con el mismo

tampón y se siguió el protocolo con todas las muestras en paralelo. Después de una incubación a 65 °C durante 15 min y agitando periódicamente, las muestras se centrifugaron a 16.000 × g y temperatura ambiente durante 1 min y se recuperó el sobrenadante.

### 9.2.3. Reversión del *cross-link*, purificación del ADN y RT-PCR

Para revertir el *cross-link*, a cada muestra se añadió 4 µL de NaCl a 5 M (concentración final de 200 mM) y se incubaron a 65 °C durante 4 h, agitando periódicamente. Seguidamente, se añadió a cada muestra 4 µL de Tris a 1 M y pH 8, 2 µL de EDTA a 500 mM y 0,2 µL de proteinasa K a 10 mg/mL (19133, Qiagen), y se incubaron a 45 °C durante 1 h. El ADN se purificó mediante extracción por columna con el *QIAquick PCR Purification Kit* (28104, Qiagen) y se eluyó en un volumen de 30 µL. La RT-PCR con *SYBR-Green* (epígrafe 3.3.1) del DNA eluido se realizó utilizando oligonucleótidos (Tabla M25) diseñados con la herramienta *NCBI/Primer-BLAST* que amplifican la región que contiene los elementos NBRE de interés dentro de los promotores de *MYOM1*, *A2M* y *SMPX*.

**Tabla M25. Oligonucleótidos para la técnica de *ChIP*.**

<b>GEN</b>	<b>OLIGONUCLEÓTIDO</b>	<b>SECUENCIA (5' - 3')</b>
MYOM1	Hs-MYOM1-ChIP-For	AGACACAGGTGACCTTTATTCAGT
	Hs-MYOM1-ChIP-Rev	ACATGTATGCAGCAGGTTGGT
A2M	Hs-A2M-ChIP-For	AGGTGCTGTACGGTAAAAGTGAG
	Hs-A2M-ChIP-Rev	CCACCCACACAAGATCTCTAAAC
SMPX	Hs-SMPX-ChIP-For	CGAACTTTGCTATACCCACTCA
	Hs-SMPX-ChIP-Rev	GTTTGATACAAGCCATACGCTG

La cuantificación del grado de unión de los factores de interés a los promotores diana se realizó mediante el método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Los resultados se corrigieron por el valor de *Ct* del *Input* y teniendo en cuenta la cantidad que representa en relación al volumen de muestra inicial. El producto de PCR obtenido se separó mediante electroforesis de ADN en gel de agarosa al 1,5% con bromuro de etidio (epígrafe 7.1). Las bandas se visualizaron bajo luz ultravioleta y las imágenes se capturaron con el equipo *Gel Doc 1000 Multi-Analyst 1.1* (BIO-RAD).

## 10. SOBRE-EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE TRANSDUCCIÓN LENTIVIRAL

La transducción es el proceso por el que se introduce en una célula material genético exógeno utilizando un virus como vector. Los lentivirus se encuentran dentro de los vectores virales más ampliamente utilizados porque son capaces de transducir células tanto quiescentes como en división, permiten insertos de tamaño medio (aproximadamente 8 kb) y se integran en el genoma de la célula huésped, dando lugar a una expresión estable del transgén a largo plazo. Esta técnica se empleó para sobre-expresar de forma constante los receptores nucleares de la familia NR4A en CMLV. Previo a la transducción, las partículas víricas son producidas por células (llamadas “empaquetadoras”) y su capacidad infectiva es caracterizada mediante titulación.

### 10.1. Producción de las partículas virales

Las partículas víricas se obtuvieron mediante el sistema *Lenti-X™ Lentiviral Expression System* (Clontech Laboratories Inc.). Este sistema incluye el vector de expresión pLVX (*pLVX-Puro*), que contiene una región MCS con dianas de restricción que permiten clonar el gen de interés bajo el control del promotor del citomegalovirus. También posee los elementos necesarios para la producción de las partículas víricas y elementos que incrementan el título viral, la integración en el genoma de la célula diana y la expresión del transgén. Este vector además codifica para un gen de resistencia a puomicina, que permite la selección de las células transducidas, y contiene la secuencia de origen pUC y un gen de resistencia a ampicilina, que permiten la replicación y selección en bacterias *E. coli*, respectivamente. Además del vector pLVX, este sistema cuenta con una mezcla de plásmidos de expresión que codifican para las proteínas virales necesarias en el proceso de producción y encapsidación de las partículas (*Lenti-X HTX Packaging Mix*), y un vehículo que facilita la entrada del ADN plasmídico a las células empaquetadoras (*Xfect Polymer*).

### 10.1.1. Construcción de los vectores de expresión lentiviral

El plásmido pLVX/NOR1 se obtuvo por la clonación en el vector pLVX del ADNc de NOR-1 humano, cedido por el Dr. Naganari Ohkura (*Growth Factor Division, National Cancer Center Research Institute, Tokio, Japón*) en el plásmido pBluescript SK-. Para ello, el plásmido del Dr. Ohkura se digirió con la enzima de restricción *EcoRI* (Fermentas) durante 1 h a 37 °C. En paralelo, el plásmido pLVX se digirió de igual forma y se defosforiló (ver apartado 3.2). Los fragmentos correspondientes al ADNc de NOR-1 (2,7 kb aprox.) y al plásmido pLVX (8,1 kb aprox.) digeridos se separaron por electroforesis en gel de agarosa, se purificaron por columna de afinidad y se ligaron (ver epígrafe 7.3). La transformación bacteriana con esta construcción y la obtención de ADN plasmídico libre de endotoxinas se realizó como se describe en el epígrafe 7.4.3.

Los plásmidos pLVX/NOR1-FLAG, pLVX/Nurr1-FLAG y pLVX/Nur77-FLAG se obtuvieron por la clonación en el vector pLVX del ADNc de NOR-1, Nurr1 y Nur77, respectivamente, que contenía una secuencia FLAG en lugar del codón de inicio de traducción. La unión de esta secuencia al ADNc permite obtener una proteína de fusión que puede ser reconocida por un anticuerpo dirigido contra la secuencia FLAG. El ADNc de los tres receptores se obtuvo por digestión enzimática de los plásmidos pCMV5/NOR1-FLAG, pCMV5/Nurr1-FLAG y pCMV5/Nur77-FLAG, cedidos por el Dr. James Hastie (*Division of Signal Transduction Therapy, University of Dundee, Scotland, Reino Unido*) y la clonación en pLVX se realizó de manera similar a la obtención del plásmido pLVX-hNOR1, descrito anteriormente.

El plásmido pLVX/EGFP (usado como control según el caso) se obtuvo por la clonación en el vector pLVX del ADNc de la forma mejorada de la proteína verde fluorescente (EGFP, *Enhanced Green Fluorescent Protein*). El ADNc de la EGFP se obtuvo mediante amplificación por PCR a partir del plásmido pIRES-EGFP (Clontech) con los oligonucleótidos 5'-CGTGGGGATCCTTTGAAAAACACGATGA-3' (*Forward*, que incorpora la diana de restricción *Bam*HI) y 5'-TATGGAAGCTTATGATCTAGAGTCGCGGCC-3' (*Reverse*, que incorpora la diana *Hind*III). La reacción de PCR se realizó con la

polimerasa *Pfu* y el producto obtenido se purificó a partir de un gel de agarosa (ver epígrafe 7.2.2). Tanto el fragmento amplificado como el vector pLVX, se digirieron con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III, se purificaron por columna de afinidad y se ligaron (ver epígrafe 7.3). La transformación bacteriana con esta construcción y la obtención de ADN plasmídico libre de endotoxinas se realizó como se describe en el epígrafe 7.4.3).

### 10.1.2. Transfección y obtención de las partículas víricas

Como células empaquetadoras se usaron las HEK-293T, que producen partículas víricas con capacidad infectiva pero incapaces de replicarse en la célula huésped. Para ello, se sembraron placas de 100 mm con  $5 \cdot 10^6$  células/placa, en 10 mL de medio sin antibióticos y con FBS sin tetraciclina (631107, Clontech Laboratories Inc.), y se incubaron durante 24 h en condiciones óptimas. A continuación, se prepararon en dos tubos por separado dos mezclas de 600  $\mu$ L de volumen total en presencia del *Xfect Reaction Buffer*: una contenía 7  $\mu$ g del vector de expresión con el transgén (epígrafe 10.1.1) o de pLVX (como control) y 36  $\mu$ L de *Lenti-X HTX Packaging Mix*, y la otra mezcla contenía 7,5  $\mu$ L de *Xfect Polymer*. Se mezcló el contenido de ambos tubos, se incubó 10 min a temperatura ambiente y se añadió gota a gota a la placa con las HEK-293T. Después de 16 h de incubación en condiciones óptimas, el medio de cultivo se reemplazó por medio completo fresco (idéntico al de siembra) y las células se incubaron nuevamente durante 48 h. Al cabo de este tiempo se recogió el sobrenadante (que contenía las partículas virales producidas), se pasó por filtros de 0,45  $\mu$ m y membrana de SFCA (cat. 431220; Corning Inc.) y se guardó alicuotado a -80 °C.

### 10.2. Determinación del título viral

La capacidad infectiva de los sobrenadantes obtenidos se determinó mediante titulación en células HeLa y posterior selección con puromicina (631306, Clontech Laboratories Inc.). En este caso, el *polybrene* (107689-10G, Sigma) añadido al medio de infección redujo la repulsión por carga entre la partícula viral y la membrana celular, favoreciendo la infección de

las células. Este procedimiento permitió determinar el número de unidades formadoras de colonia por unidad de volumen (UFC/mL), que se corresponde con el número de partículas infectivas presentes en el sobrenadante (asumiendo que cada colonia formada es representativa de una partícula viral infectiva).

Para ello, se sembraron células HeLa en placas multipocillos a razón de 100.000 células/cm<sup>2</sup> en medio completo y se incubaron en condiciones óptimas durante 24 h. Posteriormente, se sustituyó el medio de cultivo por diluciones seriadas ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ) de cada uno de los sobrenadantes obtenidos en medio completo con *polybrene* a 8 µg/mL, y las células se incubaron nuevamente durante 24 h. Transcurrido este tiempo, se comenzó la selección con medio completo fresco suplementado con puromicina a 0,8 µg/mL, cambiando el medio cada 48 h hasta la aparición de colonias individuales. Se contaron las colonias formadas en al menos tres días diferentes y se determinó el valor de UFC/mL para cada sobrenadante analizado, teniendo en cuenta el factor de dilución correspondiente y el volumen de infección añadido a cada pocillo.

### 10.3. Transducción de CMLV humanas

El valor de UFC/mL de una suspensión de virus permite determinar la multiplicidad de infección (MOI, *Multiplicity of infection*) de trabajo, que consiste en el número de partículas víricas infectivas por célula a transducir. En este caso, las transducciones de CMLV humanas para sobre-expresar NOR-1, Nurr1 y Nur77 se realizaron a una MOI de 15.

Para ello, las células se sembraron a razón de 20.000 células/cm<sup>2</sup> en placas multipocillos (para extracción ARN y proteínas totales) o en placas de 10 mm (para extracción de proteínas nucleares y la técnica de *ChIP*), y se incubaron en condiciones óptimas durante 24 h. A continuación, el medio de cultivo se reemplazó con una mezcla de infección que contenía medio completo suplementado con *polybrene* a 8 µg/mL y la cantidad de sobrenadante viral necesaria correspondiente a la MOI de trabajo. Transcurridas 24 h, el medio

de infección se reemplazó por medio de cultivo completo fresco y las células se incubaron nuevamente durante otras 24 h. Acto seguido, se comenzó la selección con medio completo suplementado con puromicina a 1,2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  durante 5-7 días, cambiando el medio cada 48 h. El enriquecimiento de la población de células infectadas se comprobó visualmente mediante microscopía de fluorescencia de células transducidas con pLVX-EGFP, tomadas como control según el caso. Según el experimento, como control también fueron usadas células transfectadas con el vector lentiviral vacío (pLVX).

### 11. ESTUDIOS DE PROLIFERACIÓN E HIPERTROFIA CELULAR

Estos ensayos se realizaron para estudiar el efecto de la sobre-expresión de NOR-1 mediante transducción lentiviral sobre la tasa de proliferación, el área celular y la síntesis de proteínas totales en CMLV humanas.

Se sembraron placas de 6 pocillos con 100.000 células/pocillo y se realizó la transducción con pLVX/NOR-1 o con pLVX (como control), tal y como se describe en el epígrafe 10.3. Todo el procedimiento se realizó también en paralelo con CMLV sin infectar. La determinación de la tasa de proliferación se hizo por conteo de células en cámara de *Neubauer* durante cinco días consecutivos, tras 24 h de selección con puromicina de las CMLV transducidas. Para ello, se tripsinizaron las células de cada pocillo, se resuspendieron en 0,5 mL de medio completo (Tabla M1) y se contaron, como se describe en el epígrafe 2.1.1. La tasa de proliferación celular se calculó dividiendo el número total de células de cada día de cultivo entre el número inicial de células.

La extracción de las proteínas totales y la determinación de la concentración de los lisados proteicos (de cada condición experimental y durante los cinco días) se realizaron como se describe en los epígrafes 4.1.1 y 4.2, respectivamente. Al quinto día de selección se capturaron imágenes de cinco campos diferentes de monocapas sub-confluentes de las CMLV transducidas

y no transducidas. La superficie celular se determinó mediante la herramienta *ImageJ 1.49*. Todos los resultados se expresaron relativos a las CMLV sin transducir.

## 12. SILENCIAMIENTO GÉNICO MEDIANTE ARN DE INTERFERENCIA

Un ARN de interferencia (siRNA, *small interfering RNA*) es una molécula de ARN de 20-25 nucleótidos diseñada para bloquear específicamente el ARNm de un gen concreto, reduciendo su expresión. Actualmente, muchas de estas moléculas cuentan con modificaciones químicas que optimizan su eficacia y especificidad. Uno de los métodos de introducir el *siRNA* dentro de la célula diana es mediante transfección.

Esta técnica se empleó para el silenciamiento de genes en CMLV y HSMM. Para silenciar la expresión de *NOR-1*, *Nurr1*, *Nur77*, *A2M* y *SMPX* se utilizaron siRNA específicos (Ambion) para cada caso (Tabla M26), mientras que el silenciamiento de los tres receptores simultáneamente se realizó con una mezcla de estas moléculas inhibidoras. El siRNA específico (o la mezcla de varios) se usó a una concentración final de 20 o 50 nM en el volumen de transfección, y se introdujo en las células utilizando el *Lipofectamine® RNAiMAX Reagent* (13778, Invitrogen).

**Tabla M26. ARN de interferencia empleados en el silenciamiento de genes**

<i>GEN</i>	<i>siRNA</i>	<i>ID</i>
NOR-1	Silencer Select Pre-designed (Inventoried) siRNA	s15541
Nurr1	Silencer Select Pre-designed (Inventoried) siRNA	s9786
Nur77	Silencer Select Pre-designed (Inventoried) siRNA	s6679
A2M	Silencer Select siRNA	s820
SMPX	Silencer Select Pre-designed siRNA	s225976
-	Silencer Select Negative Control #1	-

Para ello, las células se sembraron en medio completo sin antibióticos, a razón de 10.000 células/cm<sup>2</sup> en placas multipocillos (para ICQ y la extracción de ARN y proteínas totales) o en placas de 10 mm (para la técnica de *ChIP*), y

se incubaron en condiciones óptimas durante 24 h. Al cabo de este tiempo, el medio de cultivo se reemplazó por una mezcla de transfección, que contenía el 75% de medio de cultivo fresco idéntico al de siembra (previamente añadido a las células) y el restante 25% contenía medio OptiMEMI (31985, Gibco), la cantidad de siRNA correspondiente a la concentración de uso y 7,5  $\mu$ L de liposoma por mL de volumen de transfección. Se mezcló suavemente, se incubó 10 min a temperatura ambiente y se añadió a las células. Las placas se incubaron durante 16 h en condiciones óptimas y, acto seguido, el medio de transfección fue reemplazado por medio completo idéntico al de siembra y las células se incubaron durante 24 h (recuperación).

El silenciamiento en CMLV previamente transducidas se realizó de manera similar, reemplazando el medio de selección (epígrafe 10.3) por la mezcla de transfección con el siRNA. Por su parte, las HSMM diferenciadas se transfectaron de manera similar, aunque con algunas diferencias: una vez sembradas en medio de crecimiento, se incubaron durante 48 h en condiciones óptimas y se diferenciaron durante cinco días (epígrafe 2.1.3); la mezcla de transfección y la recuperación de las células se hicieron como se describió anteriormente, pero en presencia de medio de diferenciación.

### **13. ESTUDIOS *IN VIVO***

#### **13.1. Estabulación y supervisión de los animales**

Todos los animales fueron mantenidos en condiciones de luz/oscuridad estándares (ciclos de 12 h luz / 12 h oscuridad), a  $21 \pm 1$  °C y alimentados *ad libitum* con una dieta comercial estándar (Harlan Iberica SL, Barcelona). Los procedimientos se realizaron de acuerdo con los principios y directrices establecidos por la *American Physiological Society for Animal Research*, y aprobados por el Comité de Ética del Centro de Investigación Cardiovascular, como estipula la ley 5/1995 del 21 de junio, aprobada por la Generalitat de

Catalunya, y la normativa europea 2010/63/UE sobre la protección de animales usados para experimentación u otros fines científicos.

Para la evaluar del estado físico de los animales durante todo el procedimiento, se puntuaron los parámetros de supervisión que se indican en la Tabla M27.

**Tabla M27. Parámetros de supervisión.**

### **(PUNTUACIÓN) CRITERIO**

#### **Pérdida de peso**

- (0) Peso normal.
- (1) Menos de un 10%.
- (2) Entre un 10 y un 15%.
- (3) Consistente o rápida superior a un 20%, mantenida durante 72 horas.

#### **Aspecto físico**

- (0) Normal
- (1) Deshidratación, delgadez. Cambios en el color de la piel.
- (2) Pelo "no brillante", "despeinado". Palidez. Cianosis.
- (3) Encorvamiento. Pérdida de masa muscular.

#### **Signos clínicos**

- (0) Ninguno.
- (1) Hipotermia.
- (2) Secreciones mucosas y/o sanguinolentas por cualquier orificio. Diarrea.
- (3) Distensión abdominal. Volumen de líquido ascítico superior al 10% del peso corporal inicial. Respiración dificultosa (particularmente si va acompañada de descarga nasal y/o cianosis).

#### **Alteraciones en la conducta**

- (0) Ninguna.
- (1) Incapacidad de moverse con normalidad.
- (2) Imposibilidad de llegar a la comida/bebida. Aislamiento del resto de los animales de la jaula.
- (3) Inconsciente o comatoso. Intención de "escondarse" en la viruta, no responde a estímulos.

#### **Heridas**

- (0) Ninguna.
- (1) Arañazos.
- (2) Heridas que no cicatrizan.
- (3) Heridas ulceradas que pueden incluso supurar.

La puntuación obtenida para cada animal según estos criterios determinaría: un estado normal (puntuación de 0 a 5); la posible existencia de dolor o angustia, para lo cual habría que valorar el uso de analgésico (puntuación de

6 a 10); un sufrimiento del animal, que supone el uso obligatorio de analgésico y conllevaría valorar su sacrificio (puntuación de 11 a 15); o un sacrificio obligatorio (puntuación de 16 a 20). En los dos últimos casos, el tipo de eutanasia sería por dislocación cervical. En el caso que haya más de un parámetro con un valor de 3, automáticamente dichos parámetros adquirirán una puntuación de 4.

### **13.2. Tratamiento con LPS**

Los experimentos se realizaron con ratones salvajes (*WT*, *wild type*) de la cepa C57BL6/J, y ratones que sobre-expresan NOR-1 en células musculares lisas (Tg-NOR1),<sup>167</sup> con este mismo fondo genético. Se utilizaron machos de 2 meses de edad y se distribuyeron de forma aleatoria en cuatro grupos experimentales, de 7 ratones cada uno:

- Grupo 1: ratones *WT* control
- Grupo 2: ratones *WT* tratados con LPS
- Grupo 3: ratones Tg-NOR1 control
- Grupo 4: ratones Tg-NOR1 tratados con LPS

A los animales de los grupos 2 y 4 se les administró por vía intraperitoneal 200  $\mu$ L de una dosis de 0,5 mg LPS (Sigma)/kg de peso, diluido en solución salina (NaCl a 0,9%). Se administró el mismo volumen de solución salina a los ratones control (grupos 1 y 3). Después de 24 h de tratamiento, los ratones fueron anestesiados por vía intraperitoneal con 150  $\mu$ L de una mezcla de medetomidina (Domtor) a 1 mg/kg de peso y ketamina (Imalgene) a 75 mg/kg de peso, diluidos en solución salina. Después de asegurar la pérdida total de reflejos de los animales, la extracción de los órganos se realizó de forma rápida y en condiciones adecuadas. La aorta se aisló desde el arco hasta las arterias ilíacas, de forma rápida y bajo lupa binocular. Las muestras se conservaron en N<sub>2</sub> líquido para la extracción posterior de ARN.

### 13.3. Aislamiento de la aorta para la obtención de CMLV

Para la extracción de CMLV a partir de la aorta se utilizaron 5 ratones *WT* y 5 ratones *TgNOR-1* de 2-3 meses de edad. Los animales se sacrificaron por dislocación cervical. Se aisló la aorta como se describió anteriormente, y el vaso se sumergió en medio base DMEM con antibióticos (Tabla M1) hasta la obtención de los explantes (epígrafe 2.1.2).

## 14. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar (SD, *standard deviation*) para muestras procedentes de cultivos celulares, y como la media  $\pm$  error estándar de la media (SEM, *standard error of the mean*) para muestras procedentes de animales. Para la evaluación estadística se realizó el análisis de la varianza (ANOVA) mediante el paquete estadístico *StatView™II* (Abacus Concepts, Inc., Berkeley, CA). Se consideraron diferencias significativas para  $p < 0,05$ .

## 15. SOLUCIONES GENERALES

A continuación se muestra la composición de los tampones de uso general empleados.

<b><i>Tampón PBS (Phosphate buffer saline) 10X</i></b>	<b><i>Tampón MOPS (3-Morpholinopropane-1-sulfonic acid) 10X</i></b>
NaCl 80 g	MOPS (M1254, Sigma) 41,8 g
KCl 2 g	Acetato de sodio 6,56 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 11,43 g	EDTA (sal disódica) 0,5 M; pH 8 20 mL
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2 g	Ajustar a pH 7
Ajustar a pH 7,4	H <sub>2</sub> O libre de nucleasas c.s.p. 1 L
H <sub>2</sub> O desionizada c.s.p. 1 L	Proteger de la luz

**Tampón TBS (Tris-buffered saline) 5X**

Tris base	29,2 g
NaCl	6,05 g
Ajustar a pH 7,5	
H <sub>2</sub> O desionizada c.s.p. 1 L	

**Tampón RIPA (Radio-Immunoprecipitation Assay)**

Tris-HCl (pH 8)	50 mM
NaCl	150 mM
SDS	0,1%
Triton X-100	1%
Desoxicolato de sodio	0,5%
EDTA	2 mM

**Tampón TE (Tris-EDTA) pH 8**

Tris-HCl (pH 8)	10 mM
EDTA	1 mM

**Tampón TBE (Tris Borate-EDTA) 10X**

Tris base	108 g
Ácido bórico	55 g
EDTA (sal disódica) 0,5 M; pH 8	40 mL
H <sub>2</sub> O desionizada c.s.p. 1 L	

**TBS-Tween 0,05%**

TBS 5X	200 mL
TWEEN 20	0,5 mL
H <sub>2</sub> O desionizada c.s.p. 1 L	

**Tampón TAE (Tris Acetate-EDTA) 50X**

Tris base	242 g
Ácido acético glacial	57,08 g
EDTA (sal disódica) 0,5 M; pH 8	100 mL
H <sub>2</sub> O desionizada c.s.p. 1 L	

**PB (Phosphate buffer)**

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	56 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	12 g
Ajustar a pH 7,4	
H <sub>2</sub> O desionizada c.s.p. 1 L	



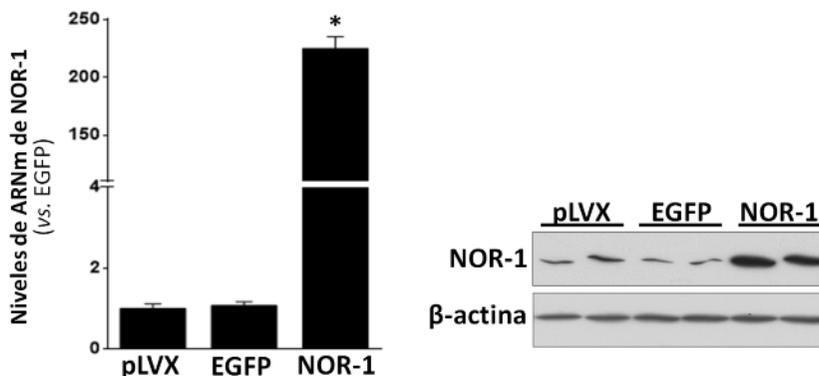
# ***RESULTADOS***



## 1. EFECTO DE LA SOBRE-EXPRESIÓN DE NOR-1 EN CMLV

### 1.1. Identificación de genes diferencialmente expresados en CMLV que sobre-expresan NOR-1

La sobre-expresión de NOR-1 en CMLV se realizó por transducción con el vector lentiviral pLVX/NOR-1 a una MOI de 15. De forma simultánea fueron transducidas CMLV con el vector vacío (pLVX) o con la construcción pLVX/EGFP, como control. Las células infectadas se seleccionaron durante 7 días con puromicina y la eficiencia de transducción se monitorizó mediante microscopía de fluorescencia, tomando como referencia la expresión de EGFP durante. Tras este período de selección se determinó que aproximadamente el 100% de las células expresaban la proteína fluorescente. Mediante PCR a tiempo real se confirmó el incremento significativo del nivel de expresión de NOR-1, con relación a CMLV control (Fig. R1). El análisis mediante *Western blot* de los niveles proteicos de estas células indicaron el mismo resultado (Fig. R1). Por otra parte, no se observaron diferencias en los niveles de ARNm y proteínas entre las células transducidas con el vector vacío y las que sobre-expresaban EGFP, de modo que se tomaron indistintamente como controles en estudios posteriores.



**Figura R1.** Niveles de ARNm (izquierda) y de proteína (derecha) de NOR-1 en CMLV transducidas con pLVX, pLVX/EGFP (EGFP) o pLVX/NOR-1 (NOR-1). Los datos fueron normalizados por los niveles de GAPDH y se expresan como la media  $\pm$  SD (n=6).  $p < 0,05$ ; \*, vs. pLVX. Los niveles de  $\beta$ -actina se usaron como control de carga en los ensayos de *Western blot*.

## RESULTADOS

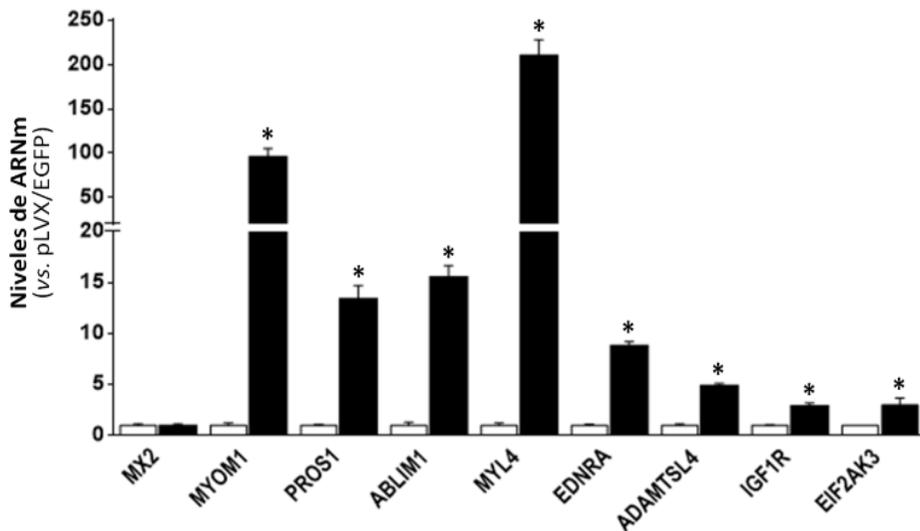
Estudios preliminares de expresión diferencial por *microarrays* a partir de CMLV en las que se sobre-expresó NOR-1 de manera similar a la anterior (Fig. R1), permitieron identificar un conjunto de genes cuyos niveles de ARNm estaban incrementados, en relación a CMLV que sobre-expresaban EGFP. Para reducir el número de genes a estudiar, se realizó un análisis *in silico* de aproximadamente 2 kb de la región promotora de cada uno de ellos. Se identificaron elementos NBRE putativos en el promotor de 11 de estos genes (Tabla R1). Algunos de los elementos identificados no estaban totalmente conservados respecto a la secuencia del elemento NBRE consenso (AAAGGTCA o TGACCTTT).

<b>Gen</b>	<b>FC</b>	<b>Elemento NBRE (posición)</b>	
<b>SMPX</b> <i>small muscle protein, X-linked</i>	378,25	AAAGGTAA	(-796/-789)*
		TAAGGTCA	(-616/-610)*
		AAAGGGCA	(-509/-502)*
		TGACATTT	(-167/-160)*
<b>A2M</b> <i>alpha-2-macroglobulin</i>	111,73	ATAGGTCA	(-586/-578)*
		TGACCTTT	(-71/-64)*
<b>MX2</b> <i>MX dynamin-like GTPase 2</i>	55,72	TGACATTT	(-602/-595)&
<b>MYOM1</b> <i>myomesin 1</i>	49,87	TGACCTTT	(-1070/-1063)*
<b>PROS1</b> <i>protein S (alpha)</i>	21,09	TGATATTT	(-1901/-1903)#
<b>ABLIM1</b> <i>actin binding LIM protein 1</i>	18,59	TGACCTTT	(-1384/-1377)#
		TGTCCTTT	(-775/-769)#
<b>MYL4</b> <i>myosin light chain 4</i>	18,50	TGACCTTG	(-1369/-1362)#
		TCACCTTT	(-2353/-2346)&
<b>EDNRA</b> <i>endothelin receptor type A</i>	12,11	TGGCCTTT	(-1003/-996)&
<b>ADAMTSL4</b> <i>a disintegrin-like and metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 1 like 4</i>	10,54	TGACCTCT	(-2072/-2065)#
		TGACCTTA	(-1575/-1568)#
<b>IGF1R</b> <i>insulin like growth factor 1 receptor</i>	2,00	TGACCTTC	(-771/-764)#
<b>EIF2AK3</b> <i>eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 3</i>	1,98	TGCCCTTT	(-1063/-1056)#
		ACAGGTCA	(-868/-861)#

**Tabla R1. Genes inducidos en CMLV que sobre-expresan NOR-1.** Se indica las veces de inducción de la expresión (FC) respecto a CMLV que sobre-expresan EGFP. Entre paréntesis se muestra la posición de los elementos en la región promotora respecto al inicio de transcripción (\*), respecto al inicio de traducción (#) o respecto al comienzo del intrón 1 en la región promotora (&). En negrita se indica la base nitrogenada no conservada con relación al elemento NBRE consenso.

Estudios preliminares de nuestro grupo identificaron a A2M (Anexo I, Figuras 5 y 6A) y a SMPX (Anexo II, Figura 2C) como posibles genes regulados por los receptores NR4A. Se decidió analizar los 9 genes restantes para identificar aquellos que pudieran estar regulados de forma directa por NOR-1.

La confirmación de la inducción del ARNm de estos genes se realizó por PCR a tiempo real a partir de CMLV que sobre-expresaban NOR-1 (Fig. R1) y se observó un aumento significativo de la expresión de MYOM1, PROS1, ABLIM1, MYL4, EDNRA, ADAMTSL4, IGF1R y EIF2AK3, en CMLV que sobre-expresaban NOR-1, con relación a células control. Por el contrario, los niveles de ARNm de MX2 se mantuvieron invariables (Fig. R2).

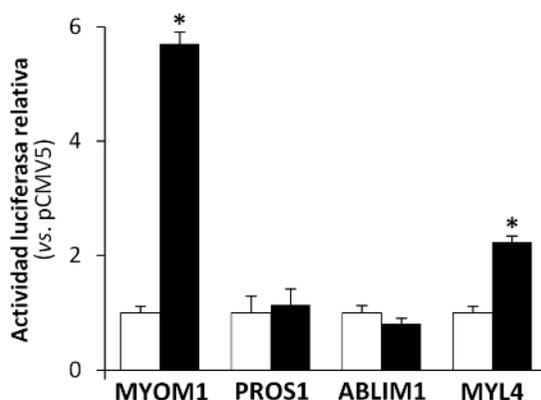


**Figura R2.** Niveles de expresión de MX2, MYOM1, PROS1, ABLIM1, MYL4, EDNRA, ADAMTSL4, IGF1R y EIF2AK3 en CMLV transducidas con pLVX/EGFP (barras blancas) o pLVX/NOR-1 (barras negras). Los datos fueron normalizados por los niveles de GAPDH y se expresan como la media  $\pm$  SD (n=6).  $p < 0,05$ : \*, vs. pLVX/EGFP.

Teniendo en cuenta la inducción observada en CMLV que sobre-expresaban NOR-1, se decidió clonar el promotor de los genes MYOM1, PROS1, ABLIM1 y MYL4 en el vector reportero de luciferasa pGL3 para realizar estudios de actividad transcripcional.

### 1.2. Estudios de actividad transcripcional: NOR-1 modula la actividad transcripcional de MYOM1 a través de un elemento NBRE

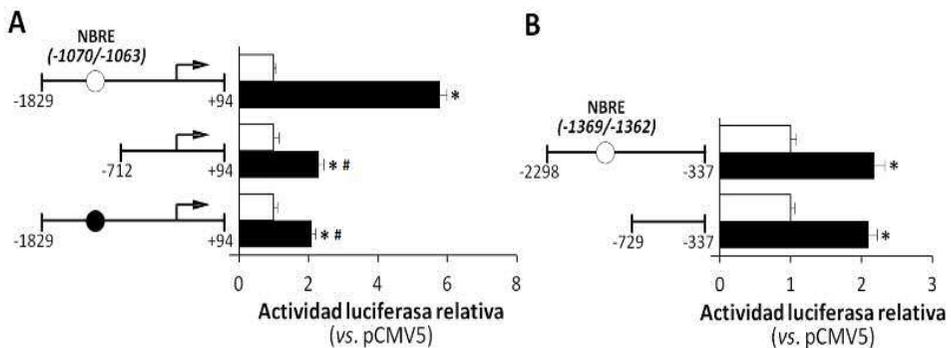
Se clonó un fragmento de aproximadamente 2 kb de la región promotora proximal de los genes seleccionados en el vector pGL3. Células de la línea NIH/3T3 o CMLV de rata fueron co-transfectadas de forma transitoria con las construcciones realizadas en pGL3 y un vector de expresión de NOR-1 (pCMV5/NOR-1). Se detectó una inducción significativa de la actividad del promotor de MYOM1 y MYL4 con relación a células control (co-transfectadas con el vector de expresión vacío, pCMV5). Por el contrario, la sobre-expresión de NOR-1 no alteró la actividad transcripcional de PROS1 y ABLIM1 (Fig. R3).



**Figura R3.** Actividad transcripcional de los promotores de MYOM1, PROS1, ABLIM1 y MYL4 en células NIH/3T3 o CMLV de rata, co-transfectadas con el vector pCMV5/NOR-1 (barras negras) o el vector pCMV5 (barras blancas). La actividad luciferasa fue normalizada por la actividad *Renilla* y los datos se expresan como la media  $\pm$  SD (n=6).  $p < 0,05$ : \*, vs. pCMV5.

Teniendo en cuenta que el fragmento de promotor de cada gen clonado en pGL3 contiene los elementos NBRE identificados *in silico* (tabla R1), se decidió determinar su implicación en la inducción de la actividad transcripcional de MYOM1 y MYL4 por NOR-1 en experimentos de transfección transitoria. Se realizaron delecciones de la zona del promotor donde se encontraba el elemento, a partir de las construcciones iniciales en pGL3. Con las construcciones delecionadas se observó una disminución

drástica de la inducción de actividad luciferasa mediada por NOR-1 con respecto a la construcción mayor correspondiente del promotor de MYOM1 (Fig. R4 A). Este efecto no se observó en el caso de MYL4, donde la actividad transcripcional no se vio afectada por la delección de la región que contenía el elemento NBRE putativo (Fig. R4 B), lo que indicó que este elemento no es responsable del incremento de la actividad luciferasa inducida por NOR-1.

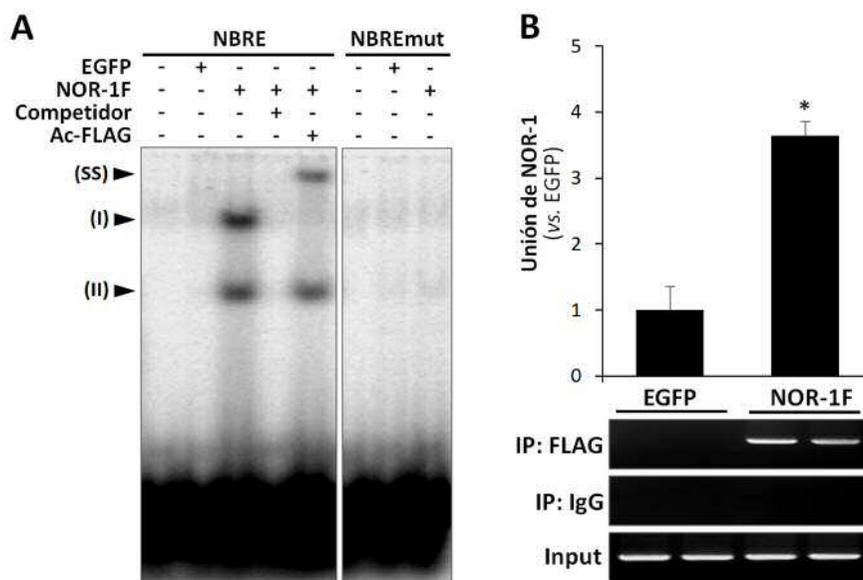


**Figura R4.** Actividad transcripcional de las construcciones de los promotores de MYOM1 (A) y MYL4 (B), en células NIH/3T3 co-transfectadas con el vector pCMV5/NOR-1 (barras negras) o el vector vacío pCMV5 (barras blancas). A la izquierda de cada panel se esquematiza el fragmento de promotor clonado en pGL3 y la posición de los elementos NBRE nativo (círculo blanco) o mutagenizado (círculo negro) respecto al inicio de transcripción (flecha). La actividad luciferasa fue normalizada por la actividad *Renilla* y los datos se expresan como la media  $\pm$  SD (n=6).  $p < 0,05$ : \*, vs. pCMV5; #, vs. construcción mayor correspondiente en presencia de pCMV5/NOR-1.

La zona del promotor de MYOM1 que mantiene la activación por NOR-1 contiene el elemento NBRE(-1070/-1063). La mutagénesis dirigida de este elemento (TGttCTTT en lugar de TGACCTTT) inhibió de forma significativa el incremento de la actividad luciferasa inducida por NOR-1 (Fig. R4 A), lo que indica que dicho elemento está implicado, al menos en parte, en la activación de la expresión de MYOM1 por NOR-1.

**1.3. NOR-1 se une *in vitro* e *in vivo* al elemento NBRE del promotor de MYOM1**

Para estudiar la capacidad de unión *in vitro* de NOR-1 al elemento NBRE identificado en el promotor de MYOM1, se realizaron ensayos de retardo de la movilidad electroforética (EMSA) con proteínas nucleares procedentes de CMLV que sobre-expresaban NOR-1 unido a una secuencia FLAG (NOR-1-FLAG) y una sonda que contenía el elemento NBRE en cuestión (Fig. R5 A).



**Figura R5. (A)** EMSA representativo realizado con proteínas nucleares de CMLV que sobre-expresan EGFP o NOR-1-FLAG (NOR-1F). Se muestran los complejos ADN-proteína formados (I y II) y el complejo retardado (SS) por la unión al anticuerpo anti-FLAG (Ac-FLAG). Se emplearon sondas marcadas con el NBRE nativo (NBRE) y con el elemento mutagenizado (NBREmut), y un exceso de sonda NBRE no marcada en ensayos de competición (Competidor). **(B)** Ensayos de ChIP efectuados en las CMLV correspondientes a (A). Las inmunoprecipitaciones se realizaron con un anticuerpo anti-FLAG (IP:FLAG) o con una IgG inespecífica (IP:IgG). Panel superior: Amplificación por PCR a tiempo real usando cebadores específicos. Los datos se normalizaron por el ADN total (*Input*), y se expresan como la media  $\pm$  SD (n=6).  $p < 0,05$ : \*, vs. EGFP. Panel inferior: Electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados.

La sobre-expresión de NOR-1-FLAG en CMLV se realizó mediante transducción lentiviral y posterior selección, como se ha descrito anteriormente (Materiales y Métodos, epígrafe 10.3). Los niveles de expresión de NOR-1-FLAG fueron muy similares a los obtenidos al sobre-expresar la forma nativa de este receptor (Fig. R1). El EMSA mostró un incremento importante en la unión a la sonda de las proteínas nucleares procedentes de CMLV que sobre-expresan NOR-1-FLAG, en comparación con los extractos nucleares de CMLV transducidas con pLVX/EGFP, tomados como control (Fig. R5 A, izquierda). El retardo del inmunocomplejo formado al preincubar con un anticuerpo contra la secuencia FLAG (Ac-FLAG) y la desaparición de ese complejo al añadir un exceso de sonda no marcada (Competidor) o mutagenizada en el NBRE (Fig. R5 A, derecha), evidencian la unión específica de NOR-1 a dicho elemento.

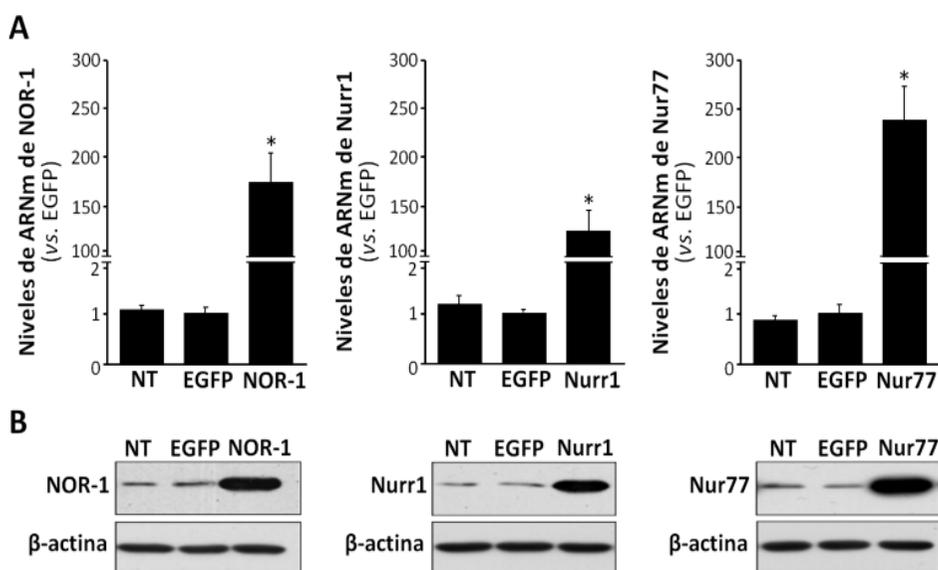
Por su parte, la capacidad de NOR-1 de unirse *in vivo* al promotor de MYOM1 se evaluó en CMLV que sobre-expresaban NOR-1-FLAG, mediante ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP). Las proteínas directamente unidas al ADN se inmunoprecipitaron con un anticuerpo contra la secuencia FLAG y el fragmento de ADN inmunoprecipitado se amplificó por PCR a tiempo real. El empleo en la amplificación de cebadores específicos que permiten obtener un fragmento que contiene el elemento NBRE(-1070/-1063) de MYOM1, permitió cuantificar específicamente la unión de NOR-1 a dicho elemento. Los resultados indican que se produce un incremento en la unión de NOR-1 al elemento NBRE en cuestión (Fig. R5 B). Por otro lado, no hubo amplificación al inmunoprecipitar con una IgG inespecífica y no se observaron diferencias en la amplificación del total del ADN fragmentado (*Input*).

Desafortunadamente, los anticuerpos comerciales disponibles contra MYOM1 no permitieron detectar inequívocamente la proteína en experimentos de *Western blot*.

**2. LOS RECEPTORES NR4A REGULAN LA ACTIVIDAD DE MMP-2 Y MMP-9 EN PARTE A TRAVÉS DE LA REGULACIÓN DE A2M**

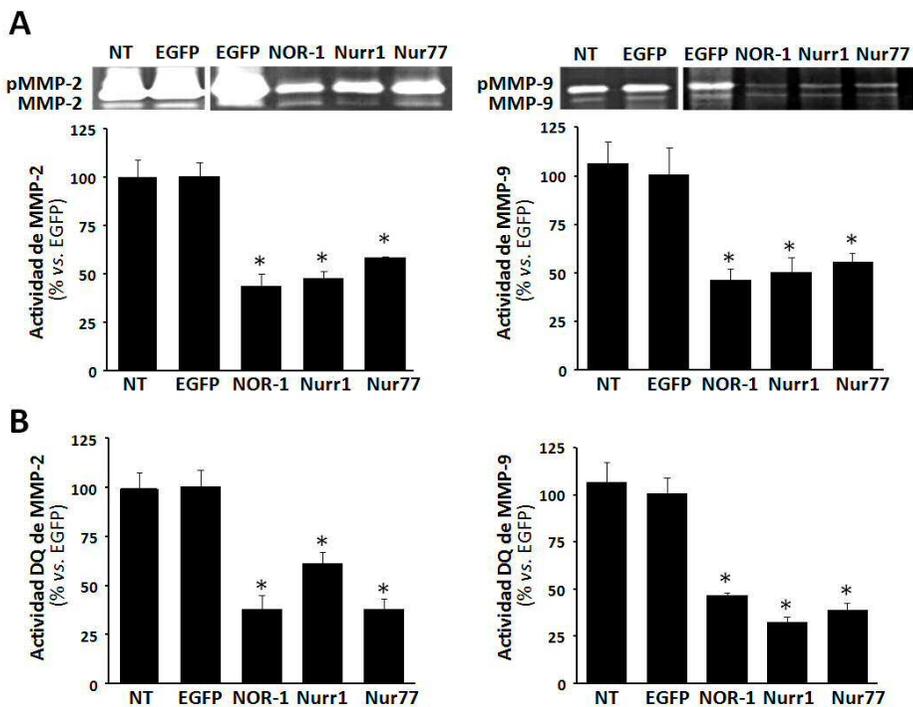
**2.1. Efecto de la sobre-expresión de los receptores NR4A sobre la actividad MMP en CMLV**

Para caracterizar el impacto de los receptores NR4A sobre la actividad MMP a nivel vascular, se sobre-expresó NOR-1, Nurr1 y Nur77 mediante infección lentiviral en CMLV. La sobre-expresión de estos receptores se verificó mediante PCR a tiempo real y *Western blot*, observándose un incremento significativo tanto a nivel de ARNm como de proteína, en relación con CMLV transducidas con el vector lentiviral que contenía el gen de la proteína EGFP (Fig. R6).



**Figura R6. (A)** Niveles de ARNm de NOR-1, Nurr1 y Nur77 en CMLV transducidas con los vectores pLVX/NOR-1 (NOR-1), pLVX/Nurr1 (Nurr1), pLVX/Nur77 (Nur77) o pLVX/EGFP (EGFP), y CMLV no transducidas (NT). Los datos fueron normalizados por los niveles de GAPDH y se expresan como la media  $\pm$  SD (n=6).  $p < 0,05$ : \*, vs. pLVX/EGFP. **(B)** Niveles proteicos de NOR-1, Nurr1 y Nur77 en los lisados de las CMLV correspondientes a (A). Los niveles de  $\beta$ -actina se usaron como control de carga.

Mediante zimografía se observó una marcada reducción de la actividad de MMP-2 y MMP-9 en los sobrenadantes de células que sobre-expresaban los receptores de la familia NR4A, en comparación con CMLV control (EGFP). (Fig. R7 A). No se observaron diferencias en la actividad gelatinasa de MMP-2 ni de MMP-9 entre las CMLV controles transducidas y las células no transducidas, lo que indica que el proceso de infección lentiviral no afecta la actividad gelatinasa de ninguna de las dos MMPs.

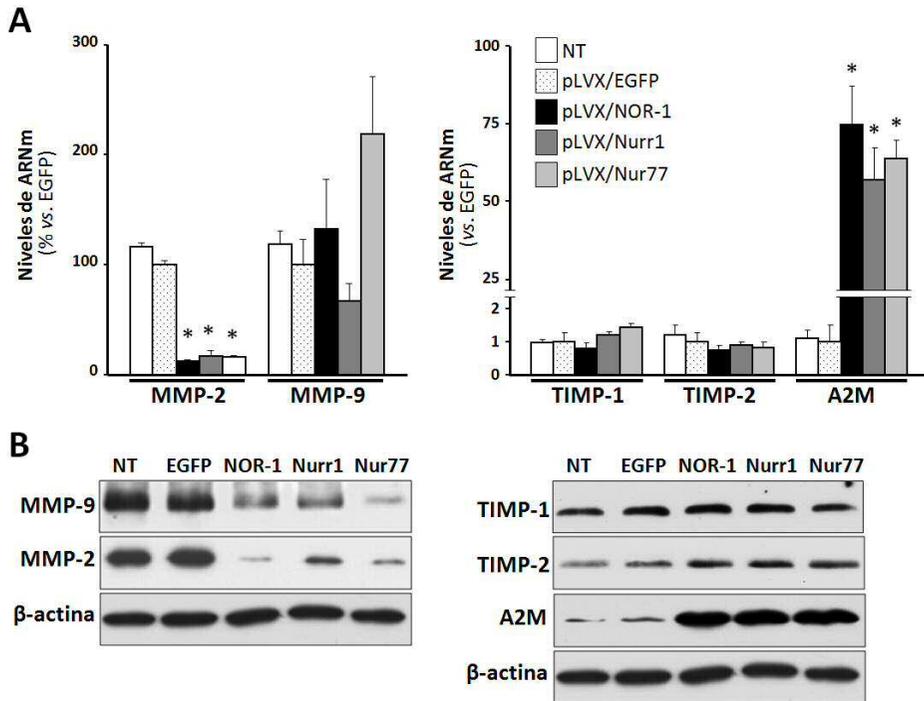


**Figura R7. (A)** Actividad de MMP-2 y MMP-9 determinada mediante zimografía en sobrenadantes de CMLV que sobre-expresan NOR-1, Nurr1 y Nur77, en comparación con sobrenadantes de CMLV que sobre-expresan EGFP y de CMLV no transducidas (NT). Paneles superiores: Geles de poliacrilamida que muestran las bandas correspondientes a los zimógenos (pMMP) y a la forma madura de las metaloproteinas (MMP). Paneles inferiores: Cuantificación por densitometría de la intensidad de las bandas MMP-2 y MMP-9, en los sobrenadantes analizados en los paneles superiores. **(B)** Actividad gelatinolítica determinada mediante el *DQ-gelatin* assay en los sobrenadantes correspondientes a (A) y en presencia de un inhibidor de MMP-9 (izquierda) o de un inhibidor de MMP-2 (derecha). Los datos de las gráficas se expresan como la media  $\pm$  SD (n=6).  $p < 0,05$ ; \*, vs. EGFP.

El análisis de la actividad gelatinasa de MMP-2 y MMP-9 mediante el *DQ-gelatin assay* mostró el mismo resultado que el observado en las zimografías (Fig. R7 B). En este caso, como el ensayo detecta la actividad gelatinasa total, la determinación de la actividad de MMP-2 se hizo en presencia de *MMP-9 inhibitor 1* (100 nM; inhibidor de MMP-9) mientras que la actividad gelatinasa de MMP-9 se analizó en presencia de *ARP100* (50 nM; inhibidor de MMP-2).

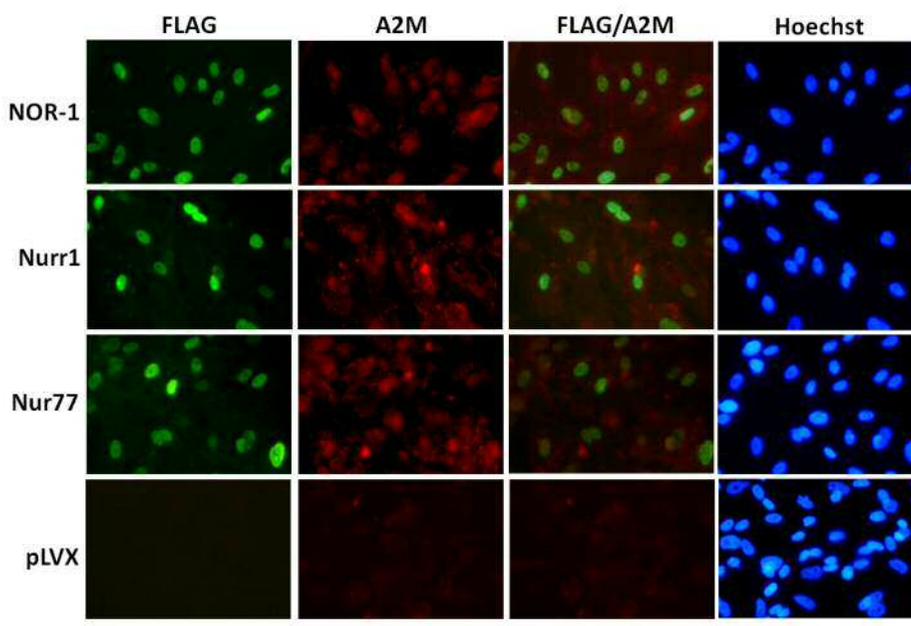
### **2.2. Niveles de expresión de MMP-2 y MMP-9, y sus inhibidores TIMP-1, TIMP-2 y A2M.**

El análisis mediante PCR a tiempo real mostró que la sobre-expresión de los receptores NR4A en CMLV redujo significativamente los niveles de ARNm de MMP-2 pero no los de MMP-9 (Fig. R8 A, izquierda). Sin embargo, los niveles proteicos de ambas metaloproteinasas estaban reducidos en los sobrenadantes de estas células (Fig. R8 B, izquierda). Por otra parte, los niveles de ARNm y proteína de los inhibidores TIMP-1 y TIMP-2 no se vieron afectados por la sobre-expresión de los receptores NR4A, a diferencia de la antiproteinasa A2M, cuya expresión se vio significativamente aumentada (Fig. R9 A y B, paneles de la derecha).



**Figura R8. (A)** Niveles de ARNm de MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 y A2M, en CMLV no transducidas (NT) y CMLV que sobre-expresan EGFP, NOR-1, Nurr1 o Nur77, transducidas con los vectores lentivirales que se indican. Los datos fueron normalizados por los niveles de GAPDH y se expresan como media  $\pm$  SD (n=6).  $p < 0,05$ : \*, vs. EGFP. **(B)** Niveles proteicos de MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 y A2M en el sobrenadante de las CMLV correspondientes a (A). Los niveles de  $\beta$ -actina se usaron como control de carga.

El incremento en los niveles proteicos de A2M debido a la sobre-expresión de los receptores NR4A también se observó en la monocapa celular. Mediante inmunocitoquímica de fluorescencia se detectó mayor cantidad de esta proteína en CMLV que sobre-expresaban NOR-1, Nurr1 y Nur77 unidos a una secuencia FLAG, con relación a CMLV transducidas con el vector lentiviral vacío (Fig. R9).



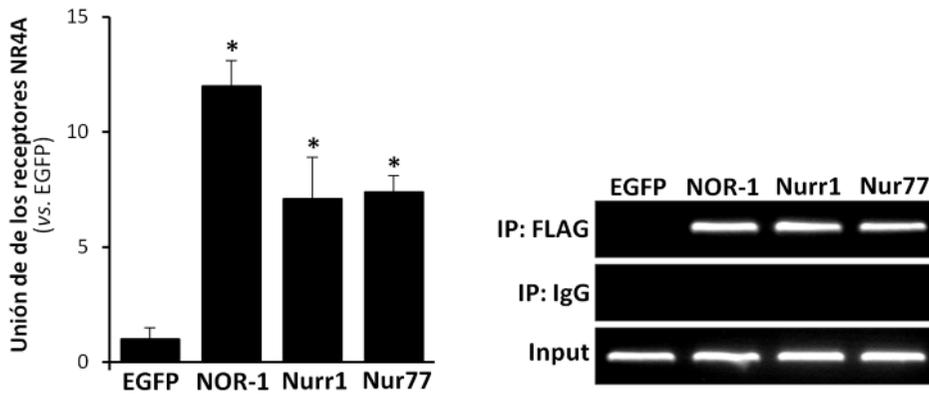
**Figura R9.** Análisis mediante inmunocitoquímica de fluorescencia, de los niveles proteicos de A2M en CMLV que sobre-expresan NOR-1, Nurr1 y Nur77 unidos a una secuencia FLAG, y CMLV transducidas con el vector lentiviral vacío (pLVX). Se detecta la secuencia FLAG presente en los tres receptores (verde), la A2M (rojo) y los núcleos (Hoechst).

### 2.3. Unión *in vivo* de los receptores NR4A al elemento NBRE(-71/-64) del promotor de A2M

Estudios preliminares de nuestro grupo indicaron que el elemento NBRE(-71/-64) ubicado en el promotor de A2M estaba relacionado con la regulación de este gen por los receptores NR4A. La funcionalidad de este elemento se caracterizó mediante estudios de actividad transcripcional y EMSA (Anexo I, Figuras 5 y 6A).

Para confirmar la unión *in vivo* de los receptores NR4A al elemento NBRE del promotor de A2M, se realizaron ensayos de CHIP en CMLV que sobre-expresaban NOR-1, Nurr1 o Nur77 unidos a una secuencia FLAG (Fig. R10). Los receptores NR4A unidos a la cromatina fueron inmunoprecipitados con

un anticuerpo anti-FLAG y, mediante PCR a tiempo real, se amplificó un fragmento de 171 pb comprendido entre las posiciones -183 y -12, que contenía al elemento NBRE(-71/-64). Se produjo una mayor unión de estos receptores al promotor de A2M en CMLV que sobre-expresaban los receptores NR4A, lo que se constató por el incremento significativo del producto amplificado con relación a CMLV control, que sobre-expresaban EGFP. Por otro lado, no hubo amplificación a partir de la inmunoprecipitación con una IgG inespecífica y no se observaron diferencias en la amplificación del ADN total fragmentado (*Input*).

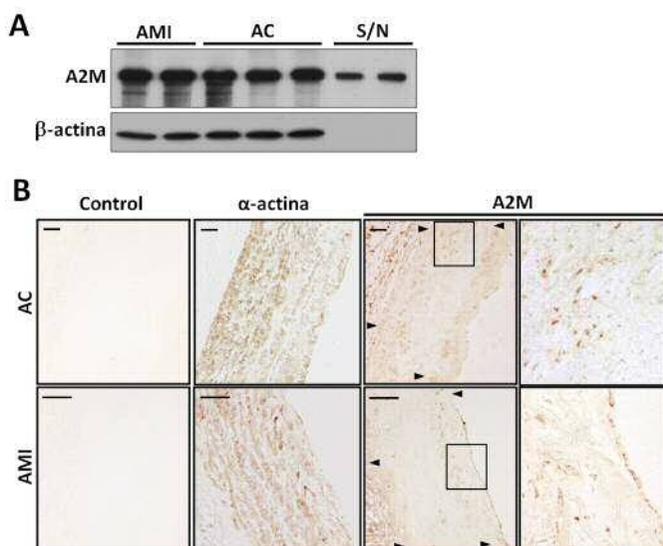


**Figura R10.** Capacidad de unión *in vivo* de los receptores NR4A al elemento NBRE(-61/-64) del promotor de A2M. Ensayos de ChIP realizados a partir de CMLV que sobre-expresan EGFP, o los receptores NOR-1, Nurr1 y Nur77 unidos a una secuencia FLAG (NOR-1, Nurr1 y Nur77, respectivamente). Las inmunoprecipitaciones se realizaron con un anticuerpo anti-FLAG (IP:FLAG) o con una IgG inespecífica (IP:IgG). Izquierda: Amplificación por PCR a tiempo real utilizando cebadores específicos a partir del ADN de la IP:FLAG. Los datos se normalizaron por el ADN total (*Input*), y se expresan como la media  $\pm$  SD (n=6).  $p < 0,05$ : \*, vs. EGFP. Derecha: Electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados.

### 2.4. A2M se expresa en la pared vascular y su expresión basal en CMLV se regula por los receptores NR4A

#### 2.4.1. Expresión de A2M en arterias humanas

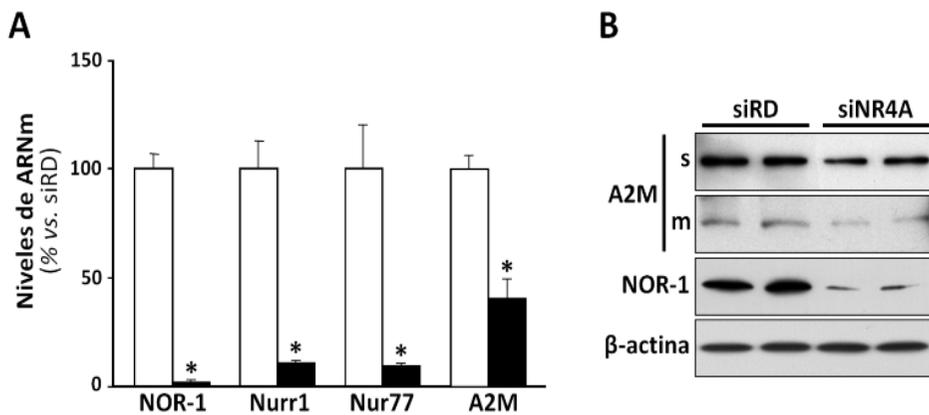
Mediante *Western blot* se valoró la expresión de A2M en aorta y arterias mamarias humanas. Se detectaron niveles significativos de A2M en arterias humanas no ateroscleróticas (Fig. R11 A). Esta técnica permitió la detección de niveles de A2M muy similares entre extractos proteicos procedentes de arterias mamarias y de arterias coronarias. Por otro lado, los análisis inmunohistoquímicos revelaron la presencia de A2M en la adventicia, la capa íntima (endotelio y sub-endotelio), y sobre todo en las CMLV de la capa media, identificadas por el marcaje de la  $\alpha$ -actina en cortes consecutivos (Fig. R11 B), lo que sugiere que estas células son la principal fuente de A2M en la capa media de estos vasos.



**Figura R11. (A)** Análisis por *Western blot* del nivel de A2M en arterias mamarias internas (AMI; n=8), arterias coronarias (AC; n=7) y sobrenadantes de CMLV en cultivo (S/N; n=6). Los niveles de  $\beta$ -actina se usaron como control de carga. **(B)** Detección por inmunohistoquímica de A2M y  $\alpha$ -actina en cortes consecutivos de arterias humanas. Control: muestras incubadas sin el anticuerpo primario. Paneles de la derecha: imágenes ampliadas de las regiones señaladas. Las flechas indican la posición de las láminas elásticas interna y externa. Barra: 50  $\mu$ m.

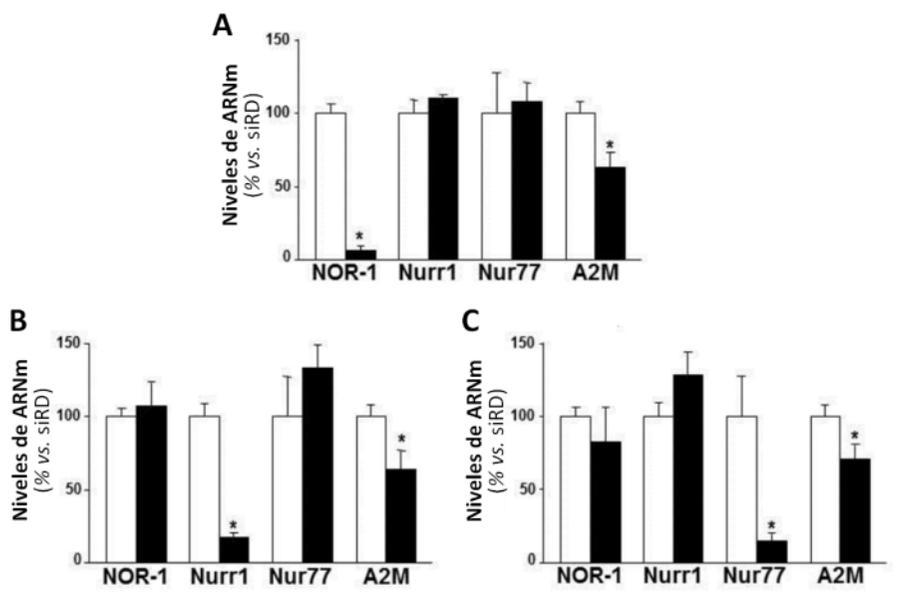
2.4.2. El silenciamiento de los receptores NR4A reduce la expresión de A2M

Para evaluar la contribución de los receptores NR4A al control basal de la expresión de A2M en CMLV humanas, se realizaron ensayos de silenciamiento con ARN de interferencia (siRNA) específicos contra NOR-1, Nurr1 y Nur77 en CMLV en cultivo. La inhibición conjunta de los tres receptores condujo a una reducción significativa del ARNm de A2M (aproximadamente un 60%), así como una disminución de los niveles proteicos en la monocapa y en el sobrenadante de estas células (Fig. R12).



**Figura R12.** (A) Niveles de ARNm de NOR-1, Nurr1, Nur77 y A2M en CMLV transfectadas con una mezcla de siRNA contra los tres receptores NR4A (siNR4A, barras negras) o con un siRNA control (siRD, barras blancas). Los datos fueron normalizados por los niveles de GAPDH y se expresan como media  $\pm$  SD (n=6).  $p < 0,05$ : \*, vs siRD. (B) Niveles proteicos de A2M en la monocapa (m) y el sobrenadante (s/n) de las células correspondientes a (A). Se muestran además los niveles proteicos de NOR-1. Los niveles de  $\beta$ -actina se utilizaron como control de carga.

De igual manera, el silenciamiento de cada uno de los receptores por separado redujo significativamente la expresión de A2M, aunque en menor medida (Fig. R13).



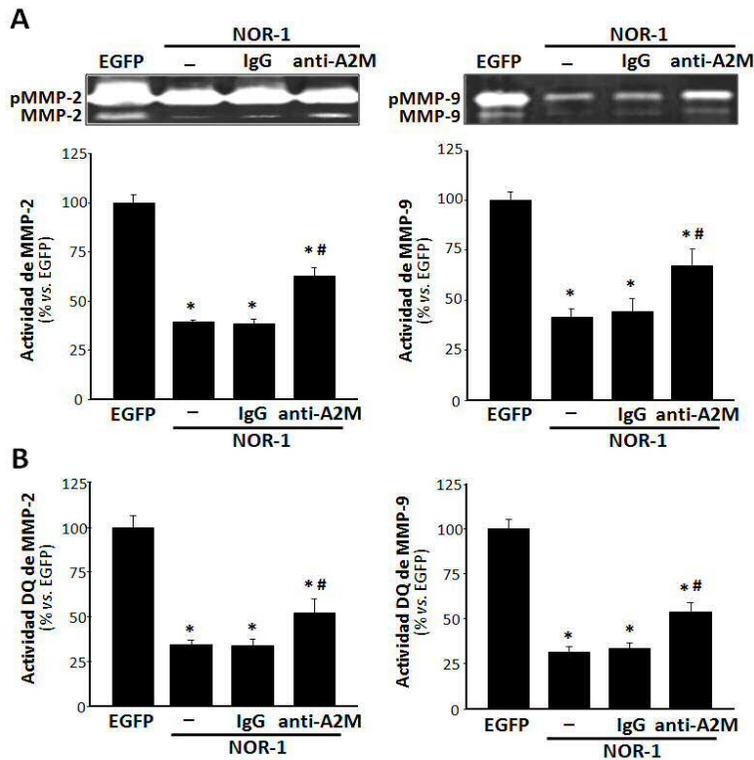
**Figura R13.** Niveles de ARNm de NOR-1, Nurr1, Nur77 y A2M en CMLV transfectadas con un *siRNA* contra NOR-1 (A), Nurr1 (B), Nur77 (C) (barras negras) o con un *siRNA* control (siRD, barras blancas). Los datos fueron normalizados por los niveles de GAPDH y se expresan como media  $\pm$  SD (n=6).  $p < 0,05$ ; \*, vs siRD.

## 2.5. El bloqueo de A2M revierte la inhibición de la actividad MMP mediada por los receptores NR4A

### 2.5.1. Efecto del bloqueo de A2M con un anticuerpo policlonal

Para determinar si la inhibición de la actividad MMP producida por los receptores NR4A (Fig. R7) está relacionada con el incremento de A2M observado, se comprobó si el bloqueo de la A2M del sobrenadante con el anticuerpo policlonal HPA002265 (Sigma) podría prevenir este efecto. Este anticuerpo reconoce epítomos ubicados en el medio de la cadena peptídica clave en la formación del complejo A2M-proteínasa.<sup>254</sup> Debido a que la actividad MMP se regulaba de manera similar con los tres receptores, estos ensayos de bloqueo se realizaron sólo con CMLV transducidas con NOR-1. El anticuerpo bloqueante o la IgG inespecífica fue añadido al medio de cultivo

24 h antes de recoger el sobrenadante de CMLV que sobre-expresaban NOR-1.



**Figura R14. (A)** Actividad de MMP-2 y MMP-9 determinada mediante zimografía en sobrenadantes de CMLV que sobre-expresan NOR-1 o EGFP, y en presencia de un anticuerpo específico contra A2M (anti-A2M) o una IgG inespecífica. Paneles superiores: Geles de poliacrilamida que muestran las bandas correspondientes a los zimógenos (pMMP) y a su forma madura correspondiente (MMP). Paneles inferiores: Cuantificación por densitometría de la intensidad de las bandas MMP-2 y MMP-9, de los paneles superiores. **(B)** Actividad gelatinolítica determinada mediante el *DQ-gelatin assay* en los sobrenadantes correspondientes a (A) y en presencia de un inhibidor de MMP-9 (panel superior) o de un inhibidor de MMP-2 (panel inferior). Los datos de las gráficas se expresan como la media  $\pm$  SD (n=6).  $p < 0,05$ : \*, vs. EGFP;  $p < 0,05$ : #, vs. NOR-1 en ausencia de anticuerpo.

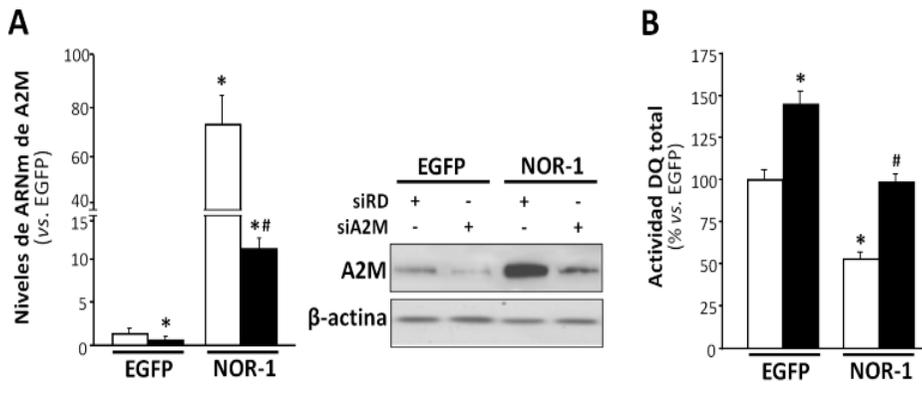
Mediante zimografía se observó que en presencia del anticuerpo que bloquea la actividad de A2M, la reducción de la actividad de MMP-2 y MMP-9 en el sobrenadante de CMLV que sobre-expresaban NOR-1 se revertía

parcialmente de forma significativa. Por el contrario, la adición de una IgG inespecífica no produjo ningún efecto (Fig. R14 A). Resultados similares se obtuvieron mediante el *DQ-gelatin assay* (Fig. R14 B).

### 2.5.2. Efecto de la inhibición de la expresión de A2M con un *siRNA*

Para comprobar si el efecto observado empleando el anticuerpo bloqueante de A2M se confirmaba silenciando la expresión de A2M, CMLV humanas que sobre-expresaban NOR-1 por transducción lentiviral se transfectaron con un *siRNA* específico contra la A2M. La eficiencia del silenciamiento del gen se comprobó mediante PCR a tiempo real y *Western blot* (Fig. R15 A), observándose una reducción significativa de la expresión de A2M tanto a nivel de ARNm (de 2,4 y 6,3 veces en CMLV que sobre-expresan EGFP y NOR-1, respectivamente) como de proteína, frente a las células transfectadas con un *siRNA* control.

El análisis de los sobrenadantes de estas células mediante el *DQ-gelatin assay* (Fig. R15 B) reveló que el silenciamiento de A2M incrementó significativamente la actividad gelatinasa total en las CMLV que sobre-expresaban EGFP, y revirtió parcialmente la disminución de esta actividad debido a la sobre-expresión de NOR-1. Estos resultados coinciden con los obtenidos al bloquear A2M con un anticuerpo específico (epígrafe 2.5.1).



**Figura R15. (A)** Izquierda: Nivel de ARNm de A2M en CMLV que sobre-expresan NOR-1 o EGFP, transfectadas con un siRNA contra A2M (siA2M, barras negras) o con un siRNA control (siRD, barras blancas). Los datos fueron normalizados por los niveles de GAPDH. Derecha: Niveles proteicos de A2M en el sobrenadante de las CMLV correspondientes al panel de la izquierda. Los niveles de  $\beta$ -actina se usaron como control de carga. **(B)** Actividad gelatinolítica total determinada mediante el *DQ-gelatin assay* en los sobrenadantes correspondientes a (A). Los datos de las gráficas se expresan como la media  $\pm$  SD (n=6).  $p < 0,05$ ; \*, vs. EGFP con siRD;  $p < 0,05$ ; #, vs. NOR-1 con siA2M.

## 2.6. NOR-1 modula la expresión vascular de las MMPs, pero no regula la expresión de A2M en ratón

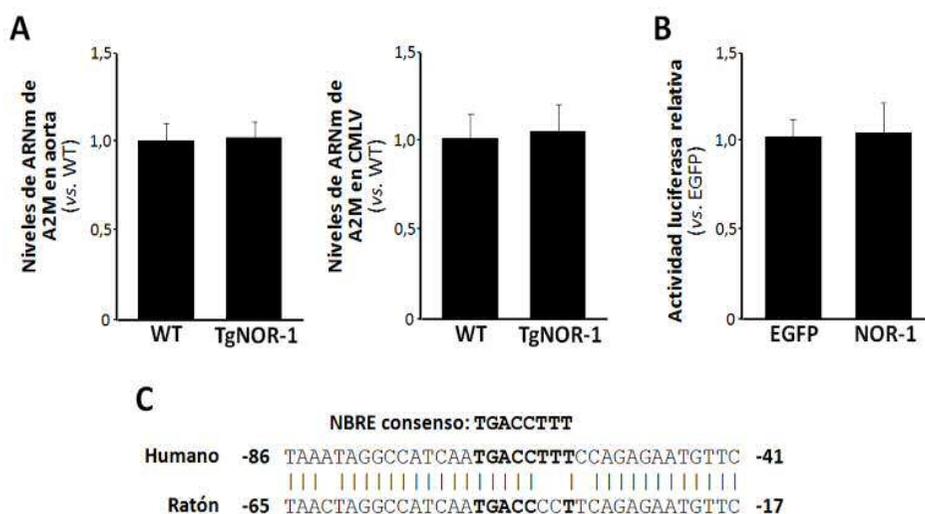
### 2.6.1. Análisis de la expresión de A2M en aorta y en CMLV de ratones que sobre-expresan NOR-1

Para estudiar si NOR-1 participa en la regulación de A2M *in vivo*, se analizó la expresión de este gen en la aorta y en CMLV procedentes de un ratón transgénico que sobre-expresa NOR-1 en estas células (TgNOR-1).<sup>167</sup> El análisis por PCR a tiempo real no mostró diferencias en la expresión de A2M entre los animales transgénicos y salvajes, ni a nivel de aorta ni en cultivos de CMLV (Fig. R16 A).

Para esclarecer el mecanismo implicado en la discrepante regulación de la A2M entre humano y ratón, se clonó un fragmento de la región proximal del promotor de A2M murino en el vector pGL3. En estudios de actividad

## RESULTADOS

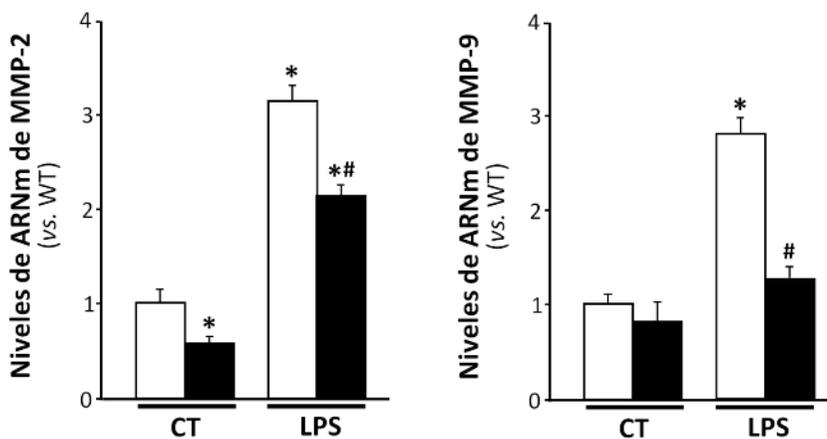
transcripcional, no se observaron diferencias en la actividad luciferasa al co-transfectar células NIH/3T3 con esta construcción y el vector de expresión de NOR-1 (pCMV5/NOR-1) o el vector pCMV5/EGFP, como control (Fig. R16 B). El alineamiento de secuencias entre este fragmento clonado y el fragmento del promotor humano donde fue identificado el elemento NBRE responsable de la respuesta a NOR-1, mostró que este elemento de respuesta no estaba conservado en el promotor murino (Fig. R16 C).



**Figura R16. (A)** Niveles de ARNm de A2M en aorta y en CMLV de aorta, de ratones salvajes (*WT*) y de ratones TgNOR-1. Los datos fueron normalizados por los niveles de TBP y se expresan como la media  $\pm$  SEM (para las muestras de aorta; n=7) o como la media  $\pm$  SD (para las muestras de CMLV; n=6). **(B)** Actividad transcripcional del promotor de A2M de ratón en células NIH/3T3 co-transfectadas con el vector pCMV5/NOR-1 (NOR-1) o el vector pCMV5/EGFP (EGFP). La actividad luciferasa fue normalizada por la actividad *Renilla* y los datos se expresan como la media  $\pm$  SD (n=6). **(C)** Alineamiento de secuencias de un fragmento de la región proximal de los promotores de A2M humano y de ratón. En negrita se indica la secuencia consenso del elemento NBRE y las bases conservadas en ambos promotores. Los números muestran la posición de los fragmentos alineados respecto al inicio de transcripción para el promotor humano y respecto al inicio de traducción para el promotor de ratón.

2.6.2. NOR-1 revierte la inducción de MMP-2 y MMP-9 en aorta de ratones tratados con LPS

Para comprobar si la sobre-expresión de NOR-1 *in vivo* podría tener algún efecto sobre los niveles de expresión de MMP-2 y MMP-9 en la pared vascular, se analizaron los niveles de ARNm de ambas gelatinasas en la aorta de animales TgNOR-1 en condición basal y tras tratamiento de 24 h con LPS (Fig. R17). Como sucedía en CMLV humanas y en condiciones basales, la sobre-expresión de NOR-1 redujo los niveles de ARNm de MMP-2 pero no los de MMP-9. Sin embargo, el incremento de la expresión de ambas gelatinasas en respuesta a LPS fue significativamente menor en los animales TgNOR-1, frente a ratones salvajes.

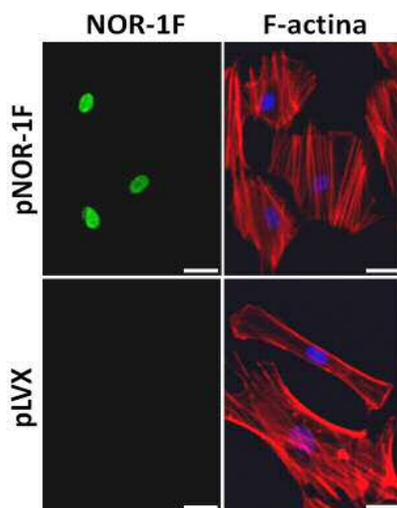


**Figura R17.** Niveles de ARNm de MMP-2 y MMP-9 en aorta de ratones salvajes (WT; barras blancas) y de ratones TgNOR-1 (barras negras). La mitad de los animales de cada grupo (n=14) fue tratada con LPS o con solución salina (CT). Los datos fueron normalizados por los niveles de TBP y se expresan como la media  $\pm$  SEM (n=7).  $p < 0,05$ : \*, vs. WT con solución salina;  $p < 0,05$ : #, vs. WT con LPS.

### 3. NOR-1 REGULA LA EXPRESIÓN DE SMPX Y LA DIFERENCIACIÓN DE MIOBLASTOS DE MÚSCULO ESQUELÉTICO HUMANO

#### 3.1. La sobre-expresión de NOR-1 en CMLV humanas disminuye la proliferación y provoca hipertrofia celular

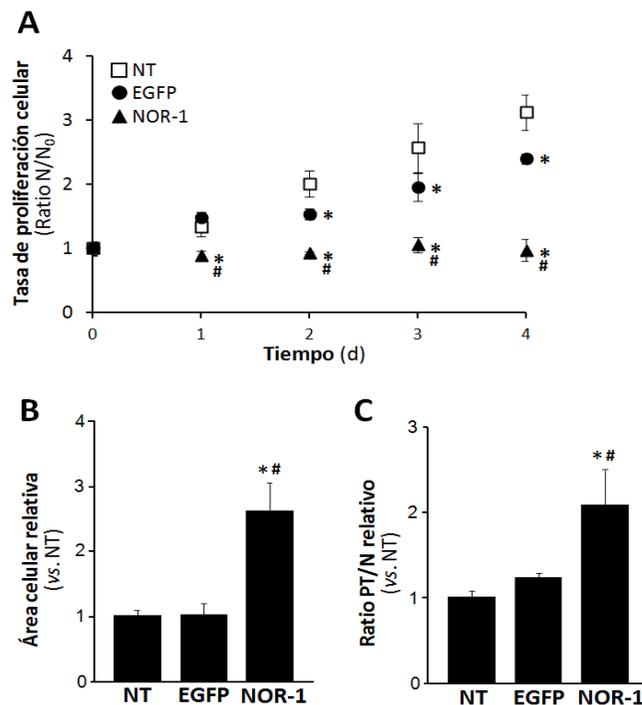
Las CMLV humanas infectadas con un vector lentiviral para sobre-expresar NOR-1-FLAG murino experimentaban un cambio morfológico evidente en relación a las transducidas con el vector pLVX/EGFP o con el vector lentiviral vacío (pLVX) (Fig. R18).



**Figura R18.** Análisis mediante inmunocitoquímica de fluorescencia en CMLV transducidas con pLVX/NOR-1-FLAG (pNOR-1F) o con el vector vacío (pLVX). En verde se muestra la tinción de NOR-1 (NOR-1F), usando un anticuerpo anti-FLAG; en rojo, la F-actina, y en azul, los núcleos (Hoechst). Barra: 25  $\mu$ m.

El seguimiento de la tasa proliferativa de estas células durante cuatro días en medio completo mostró que las CMLV transducidas presentaban una menor tasa de proliferación que las no transducidas (Fig. R19 A). Cabe destacar que las CMLV que sobre-expresan NOR-1 mostraron una tasa proliferativa menor que las CMLV transducidas con pLVX/EGFP.

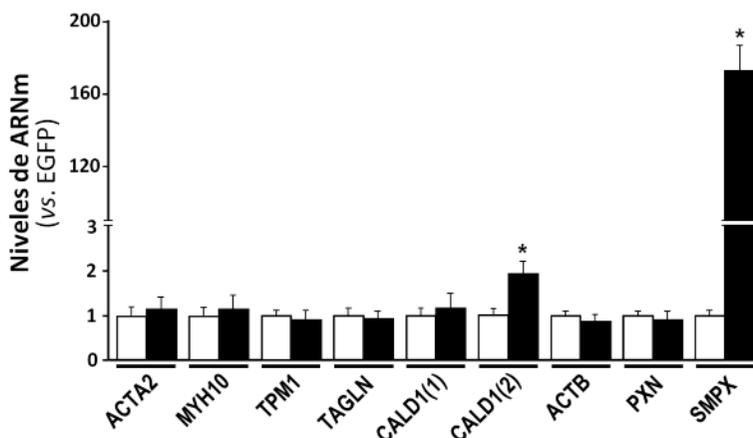
La determinación del área celular indicó que las CMLV que sobre-expresaban NOR-1 tenían una superficie aproximadamente 2,6 veces mayor que las células no transducidas o las transducidas con pLVX/EGFP, mientras que entre las dos últimas no se observaron diferencias (Fig. R19 B). Análogamente, se observó que CMLV que sobre-expresaban NOR-1 sintetizaban 2,1 veces más proteína que las células no transducidas y 1,7 veces más que las transducidas con pLVX/EGFP; ambas diferencias estadísticamente significativas (Fig. R19 C). Por el contrario, no se observaron diferencias entre CMLV transducidas o no con el vector pLVX/EGFP.



**Figura R19. (A)** Tasa de proliferación celular de CMLV transducidas con pLVX/NOR-1-FLAG (NOR-1) o con pLVX/EGFP (EGFP), y de CMLV no transducidas (NT). N: número de células; N<sub>0</sub>: número inicial de células determinado el primer día del estudio de proliferación. **(B,C)** Determinación (relativa a NT) del área celular (B), y del ratio entre la cantidad de proteína total (PT) y el número de células (N) (B). Análisis realizados al cuarto día del inicio del estudio. Los datos se expresan como la media ± SD (n=6); \*:  $p < 0,05$  vs. NI; #:  $p < 0,05$  vs. EGFP.

**3.2. NOR-1 regula los niveles de ARNm y de proteína de CALD1 y SMPX**

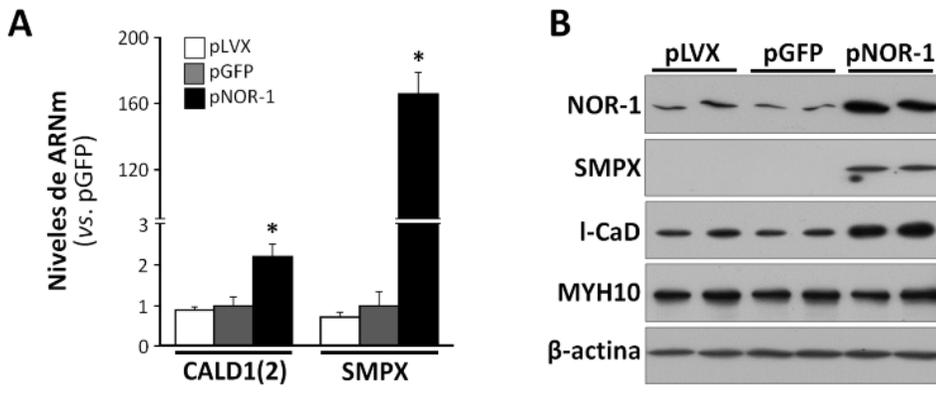
El análisis de la expresión de diferentes genes relacionados con el citoesqueleto en CMLV que sobre-expresaban NOR-1 (Fig. R18) mostró un incremento significativo de 1,9 veces en los niveles de expresión del transcrito de CALD1 correspondiente a la variante proteica más ampliamente expresada (l-CaD), y un aumento de aproximadamente 170 veces en los niveles de ARNm de SMPX (Fig. R20). Por el contrario, no se vieron alterados los niveles de expresión de ACTA2, MYH10, TPM1, TAGLN, ACTB, PXN ni del otro transcrito de CALD1 analizado, correspondiente a la variante proteica específica de célula muscular lisa (h-CaD).



**Figura R20.** Niveles de ARNm de diferentes genes del citoesqueleto en CMLV transducidas con pLVX/NOR-1-FLAG (barras negras) o con pLVX/EGFP (EGFP; barras blancas). CALD1(1) y CALD1(2): transcritos correspondientes a las variantes proteicas h-CaD y l-CaD, respectivamente. Los datos se normalizaron por los niveles de TBP y se expresan como la media  $\pm$  SD (n=6); \*:  $p < 0,05$  vs. EGFP.

La inducción significativa de los niveles de ARNm de SMPX y de uno de los transcritos de CALD1 también fue observada en CMLV que sobre-expresaban NOR-1 humano (Fig. R21 A). La inducción de la expresión de SMPX confirma la expresión diferencial de este gen en los estudios previos de *microarrays* (epígrafe 1.1). El análisis por *Western blot* de extractos proteicos de estas

células corroboró la regulación por NOR-1 observada a nivel de ARNm (Fig. R21 B).



**Figura R21. (A)** Niveles de ARNm de CALD1 y SMPX en CMLV transducidas con el vector vacío (pLVX), pLVX/EGFP (pEGFP) o pLVX/NOR-1 (pNOR-1). Los datos fueron normalizados por los niveles de TBP y se expresan como media  $\pm$  SD (n=6).  $p < 0,05$ ; \*, vs. pEGFP. **(B)** Niveles proteicos de NOR-1, SMPX, CALD1 y MYH10 en las CMLV correspondientes a (A). Los niveles de  $\beta$ -actina se usaron como control de carga.

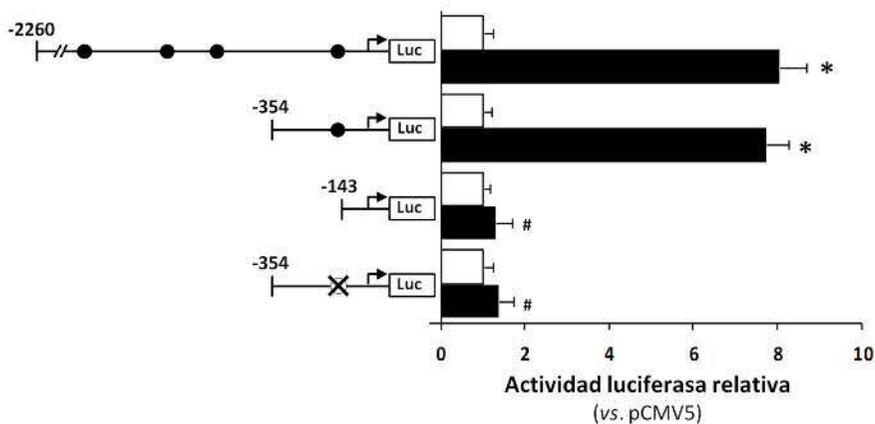
El hecho de no observarse diferencias a nivel de ARNm o a nivel proteico de los genes de interés entre células que sobre-expresan EGFP y las transducidas con el vector vacío, nos permitió considerar indistintamente como controles cualquiera de estas dos condiciones para estudios posteriores.

### 3.3. NOR-1 se une *in vivo* a un elemento NBRE no canónico del promotor de SMPX

El análisis *in silico* del promotor de CALD1 no permitió identificar ningún elemento de respuesta a NOR-1. En cambio, en el promotor de SMPX se identificaron cuatro posibles elementos en la región promotora proximal (entre las posiciones -2260 y +34, respecto al inicio de transcripción del gen) (Tabla R1). Ensayos de actividad transcripcional en CMLV de rata co-transfectadas con diferentes construcciones del promotor de SMPX y un vector de expresión de NOR-1 indicaban que el elemento NBRE más

## RESULTADOS

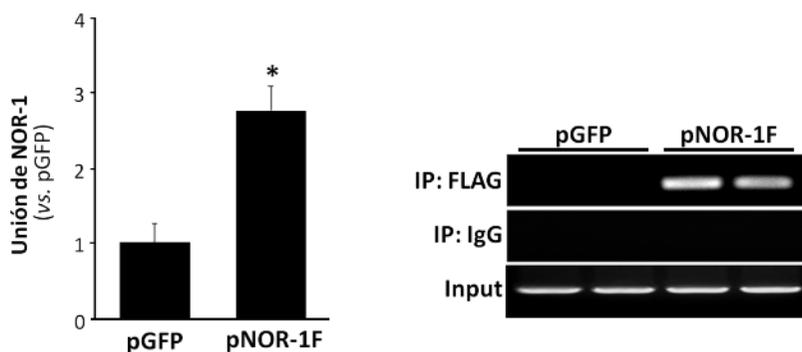
proximal (en la posición -167/-160) era el responsable de la respuesta a NOR-1 (Fig. R22). En estos ensayos se observó un incremento significativo de la actividad luciferasa en las células co-transfectadas con la construcción que contenía el fragmento comprendido entre las posiciones -2260 y +64 (construcción mayor). La delección de los tres elementos NBRE más distales no afectó el incremento de la actividad luciferasa provocado por NOR-1. Por el contrario, tanto la delección del elemento NBRE(-167/-160) como su mutagénesis impidió el incremento de la actividad luciferasa mediado por NOR-1. Estos resultados concordaban con los resultados preliminares de los ensayos de EMSA (Anexo II, Fig. 2C).



**Figura R22.** Actividad transcripcional de las construcciones del promotor de SMPX en CMLV de rata co-transfectadas con el vector pCMV5/NOR-1 (barras negras) o el vector vacío pCMV5 (barras blancas). A la izquierda de cada panel se esquematiza el fragmento de promotor clonado en pGL3 y la posición de los elementos NBRE nativo (círculo negro) o mutagenizado (círculo marcado con X) respecto al inicio de transcripción (flecha). La actividad luciferasa fue normalizada por la actividad *Renilla* y los datos se expresan como la media  $\pm$  SD (n=6).  $p < 0,05$ : \*, vs. pCMV5; #, vs. construcción mayor correspondiente en presencia de pCMV5/NOR-1.

Para confirmar la unión *in vivo* de NOR-1 al elemento NBRE(-167/-160), se realizaron ensayos de ChIP en CMLV que sobre-expresaban NOR-1-FLAG. Al inmunoprecipitar la cromatina con un anticuerpo anti-FLAG se observó que la sobre-expresión de NOR-1 indujo un aumento significativo en la

amplificación por PCR a tiempo real de la región del promotor de SMPX (fragmento de 167 pb) que contenía el elemento NBRE(-167/-160), frente a las células transducidas con el vector pLVX/EGFP (Fig. R23).

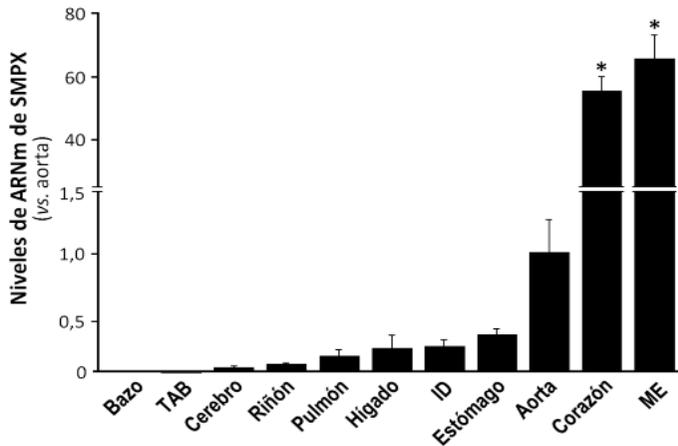


**Figura R23.** Capacidad de unión *in vivo* de NOR-1 al NBRE del promotor de SMPX(-167/-160). Ensayos de CHIP realizados a partir de CMLV transducidas con pLVX/EGFP (pGFP) o pLVX/NOR-1-FLAG (pNOR-1F). Las inmunoprecipitaciones se realizaron con un anticuerpo anti-FLAG (IP:FLAG) o con una IgG inespecífica (IP:IgG). Izquierda: Amplificación por PCR a tiempo real usando cebadores específicos a partir del ADN de la IP:FLAG. Los datos se normalizaron por el ADN total (*Input*), y se expresan como la media  $\pm$  SD (n=6).  $p < 0,05$ ; \*, vs. pGFP. Derecha: Electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados.

### 3.4. SMPX se expresa mayormente en músculo esquelético

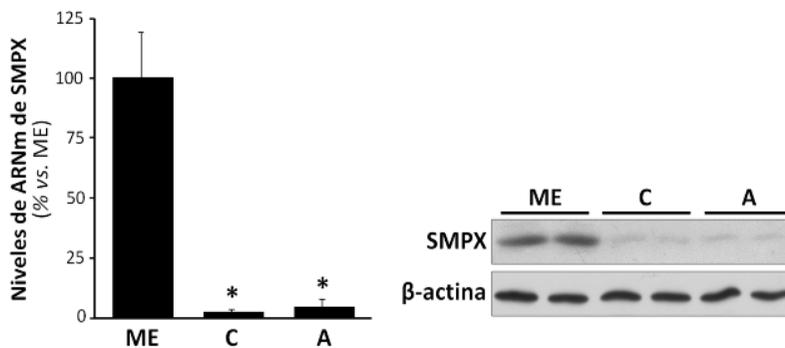
Se analizó la expresión de SMPX en un conjunto de tejidos y órganos de ratón y se observó una expresión predominante en músculo estriado y cardíaco y, en menor medida, en tejidos ricos en células de musculatura lisa (Fig. R24), patrón de expresión que está de acuerdo con resultados de otros autores.<sup>233</sup>

## RESULTADOS



**Figura R24.** Expresión de SMPX en muestras de tejidos y órganos murinos. Los datos fueron normalizados por los niveles de TBP y se expresan como la media  $\pm$  SEM.  $p < 0,05$ ; \*, vs. aorta. TAB: tejido adiposo blanco; ID: intestino delgado; ME: músculo esquelético.

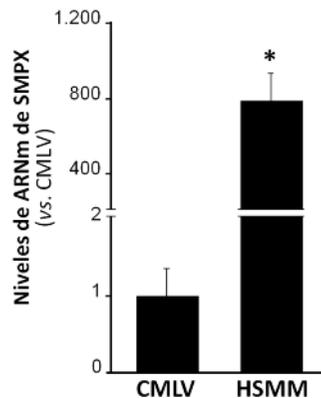
El análisis de estos niveles de expresión en muestras humanas mostró resultados similares. Se observó niveles elevados de ARNm y proteína de SMPX en músculo esquelético, mientras que los de arteria coronaria y aorta eran muy inferiores (Fig. R25 A), pues constituían menos del 15% de la expresión génica observada en músculo esquelético.



**Figura R25.** Niveles de ARNm (izquierda) y de proteína (derecha) de SMPX en muestras humanas de músculo esquelético (ME;  $n=4$ ), arteria coronaria (C;  $n=7$ ) y aorta (A;  $n=6$ ). Los datos fueron normalizados por los niveles de TBP y se expresan como la media  $\pm$  SEM.  $p < 0,05$ ; \*, vs. ME. Los niveles de  $\beta$ -actina se usaron como control de carga.

### 3.5. El silenciamiento de NOR-1 reduce los niveles de expresión de SMPX en HSMM

Para continuar con la caracterización de la regulación de SMPX por NOR-1, se realizaron ensayos de silenciamiento génico con siRNA específicos. Debido al bajo nivel de expresión basal de SMPX en CMLV, estos ensayos se realizaron en células de músculo esquelético (HSMM). El análisis de la expresión basal de SMPX en ambos tipos celulares mediante PCR a tiempo real, mostró que las HSMM expresaban casi 800 veces más este gen que las CMLV, cuya expresión estaba muy cerca del límite de detección del ensayo (Fig. R26).

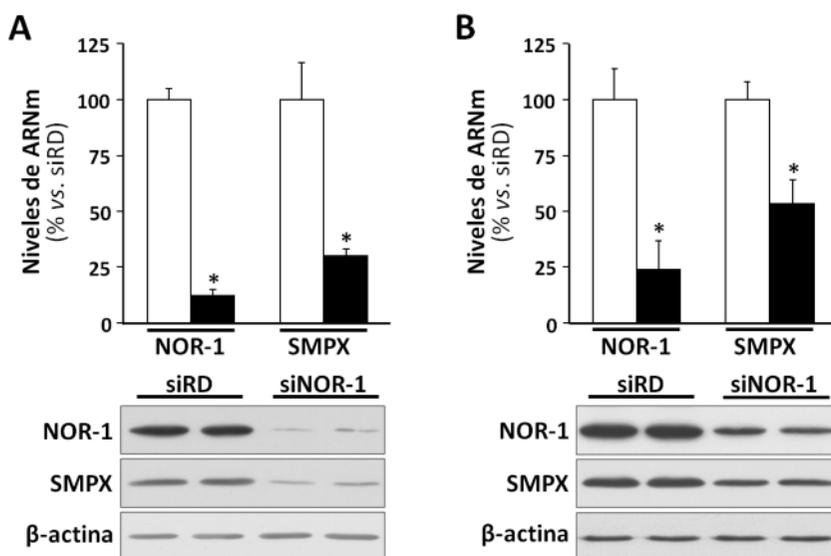


**Figura R26.** Niveles de ARNm de SMPX en cultivos de CMLV y HSMM. Los datos fueron normalizados por los niveles de TBP y se expresan como la media  $\pm$  SD (n=6).  $p < 0,05$ : \*, vs. CMLV.

La transfección de HSMM mantenidas en medio de crecimiento con un siRNA contra NOR-1 (siNOR-1) redujo significativamente los niveles de ARNm de NOR-1 y SMPX (reducción aproximada del 88% y el 70%, respectivamente), al comparar con HSMM transfectadas con un siRNA control (Fig. R27 A, panel superior). Esta disminución se tradujo en una reducción de los niveles proteicos de NOR-1 y SMPX, analizados por *Western blot* (Fig. R27 A, panel inferior). De igual forma, el silenciamiento de NOR-1 usando esta misma estrategia en HSMM cultivadas en medio de diferenciación (Tabla M2) redujo significativamente los niveles de NOR-1 y

## RESULTADOS

SMPX, frente a HSMM transfectadas con un siRNA control (Fig. R27 B, panel superior). En este caso, la expresión de NOR-1 se redujo aproximadamente en un 76%, y la de SMPX, cerca de un 47%. Ensayos de *Western blot* confirmaron estos efectos a nivel proteico (Fig. R27 B, panel inferior).



**Figura R27.** Niveles de ARNm (paneles superiores) y de proteína (paneles inferiores) de NOR-1 y SMPX, en HSMM cultivadas en medio de crecimiento **(A)** o en medio de diferenciación **(B)**. Las células fueron transfectadas con el siNOR-1 (barras negras) o con un siRNA control (siRD; barras blancas). Los datos fueron normalizados por los niveles de TBP y se expresan como la media  $\pm$  SD (n=6).  $p < 0,05$ : \*, vs. siRD. Los niveles de  $\beta$ -actina se usaron como control de carga.

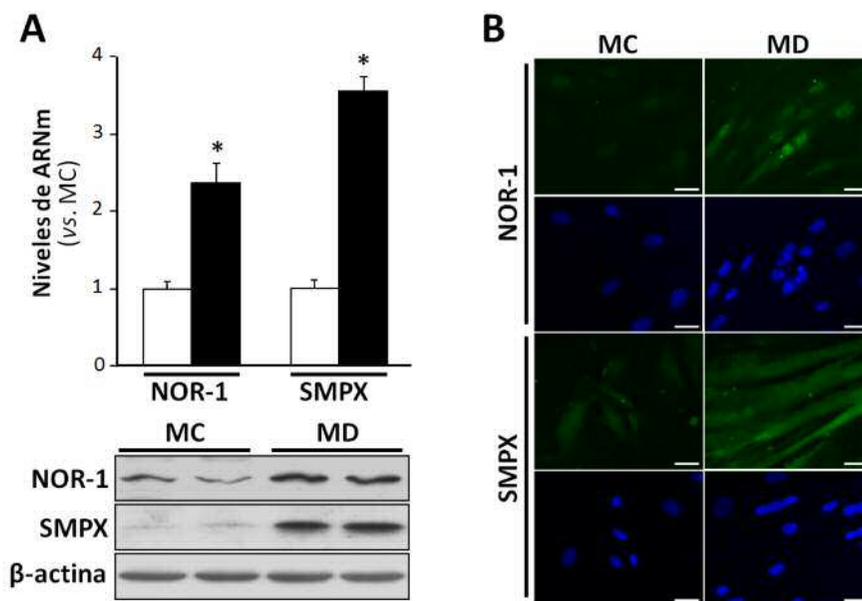
### 3.6. La diferenciación de HSMM incrementa los niveles de expresión de SMPX de forma dependiente de NOR-1

#### 3.6.1. La diferenciación de HSMM incrementa los niveles de ARNm y de proteína de NOR-1 y SMPX

Se analizó la expresión de NOR-1 y SMPX en HSMM cultivadas en medio de crecimiento y en medio de diferenciación (Tabla M2). Las HSMM cultivadas en medio de diferenciación durante cinco días presentan una expresión

superior de NOR-1 y SMPX (alrededor de 2,4 y 3,5 veces, respectivamente) en relación a la de las HSMM cultivadas en medio de crecimiento (Fig. R28 A).

Acorde a este resultado, los niveles de ambas proteínas, analizados por *Western blot* e inmunocitoquímica de fluorescencia (Fig. R27 B), estaban también aumentados en condiciones de diferenciación. Además, se observaron cambios evidentes en la morfología de las HSMM cultivadas en medio de diferenciación, que adquirieron un fenotipo de células diferenciadas (miotubos), alargadas y polinucleadas.

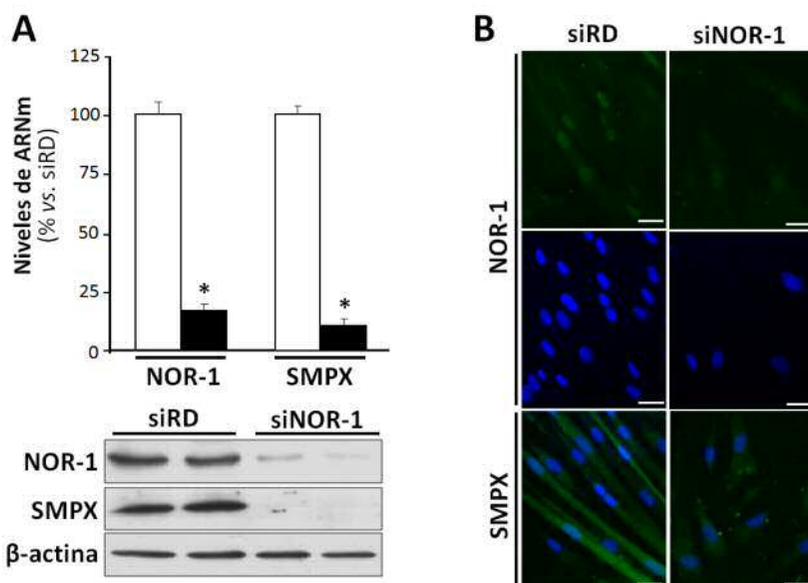


**Figura R28. (A)** Niveles de ARNm (panel superior) y de proteína (panel inferior) de NOR-1 y SMPX, en HSMM diferenciadas (MD; barras negras) y no diferenciadas (MC; barras blancas). Los datos fueron normalizados por los niveles de TBP y se expresan como la media  $\pm$  SD (n=6).  $p < 0,05$ : \*, vs. ND. Los niveles de  $\beta$ -actina se utilizaron como control de carga. **(B)** Inmunocitoquímica de fluorescencia de las células correspondientes a (A). En verde se muestra la tinción de NOR-1 y SMPX, y en azul, los núcleos (Hoechst). Barra: 25  $\mu$ m.

### 3.6.2. El incremento de la expresión de SMPX durante la diferenciación de HSMM depende de NOR-1

Para determinar si el aumento de la expresión de SMPX observado durante el proceso de diferenciación estaba relacionado con NOR-1, se transfectaron HSMM con el siNOR-1 y posteriormente se cultivaron en medio de diferenciación durante cinco días.

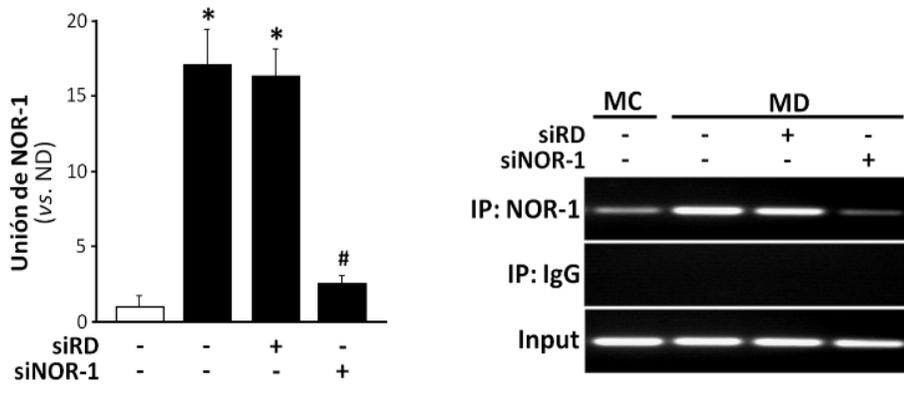
El silenciamiento de NOR-1 provocó una reducción aproximada del 84% de sus niveles de expresión y un descenso de casi el 90% de la expresión de SMPX (Fig. R29 A), con relación a HSMM transfectadas con un siRNA control. Este efecto también se observó a nivel proteico mediante *Western blot* e inmunocitoquímica de fluorescencia (Fig. R29 B).



**Figura R29. (A)** Niveles de ARNm (panel superior) y de proteína (panel inferior) de NOR-1 y SMPX, en HSMM transfectadas con el siNOR-1 (barras negras) o con un siRNA control (siRD; barras blancas), y posteriormente cultivadas en medio de diferenciación durante cinco días. Los datos fueron normalizados por los niveles de TBP y se expresan como la media  $\pm$  SD (n=6).  $p < 0,05$ : \*, vs. siRD. Los niveles de  $\beta$ -actina se usaron como control de carga. **(B)** Inmunocitoquímica de fluorescencia de las células correspondientes a (A). En verde se muestra la tinción de NOR-1 y SMPX, y en azul, los núcleos (Hoechst). Barra: 25  $\mu$ m.

3.6.3. El silenciamiento de NOR-1 previene la unión de este receptor al elemento NBRE del promotor de SMPX inducida por la diferenciación

Estudios de CHIP realizados a partir de HSMM indicaron un incremento significativo en la capacidad de unión de NOR-1 al elemento NBRE(-167/-160) del promotor de SMPX en HSMM diferenciadas (Fig. R30). Este incremento se inhibió de forma significativa cuando se silenció NOR-1 y las HSMM transfectadas se cultivaron durante cinco días en medio de diferenciación. Por el contrario, en las células transfectadas con un siRNA control se observó una capacidad de unión similar a la de células diferenciadas sin transfectar.

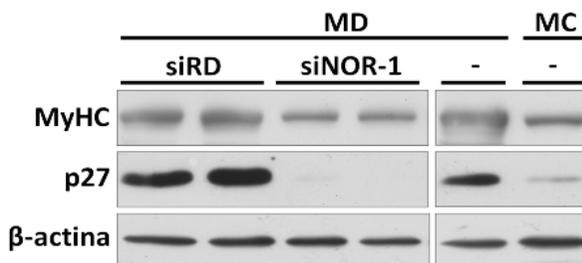


**Figura R30.** Capacidad de unión *in vivo* de NOR-1 al NBRE(-167/-160) del promotor de SMPX, en HSMM previamente transfectadas con el siNOR-1 o con un siRNA control (siRD) y luego mantenidas en medio de crecimiento (MC; barra blanca) o en medio de diferenciación (MD; barras negras) durante cinco días. Las inmunoprecipitaciones se realizaron con un anticuerpo anti-NOR-1 (IP:NOR-1) o una IgG inespecífica (IP:IgG). Izquierda: Amplificación por PCR a tiempo real usando cebadores específicos a partir del ADN de la IP:NOR-1. Los datos se normalizaron por el ADN total (*Input*), y se expresan como la media  $\pm$  SD (n=6).  $p < 0,05$ : \*, vs. MC; #, vs. siRD. Derecha: Electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados.

### **3.7. El silenciamiento de NOR-1 afecta la diferenciación de HSMM de forma independiente a la expresión de SMPX**

#### **3.7.1. NOR-1 regula los niveles proteicos de los marcadores de diferenciación MyHC y p27 en HSMM**

Se evaluó el efecto del silenciamiento de NOR-1 sobre el proceso de diferenciación mediante el análisis por *Western blot* de los marcadores de diferenciación celular p27 y MyHC. En las células donde se había silenciado NOR-1 se observó una reducción significativa de ambos marcadores (Fig. R31). Igualmente fue analizada como referencia la expresión de estos marcadores en HSMM no diferenciadas y diferenciadas (ambas sin transfectar), cultivadas en medio de crecimiento y en medio de diferenciación, respectivamente.

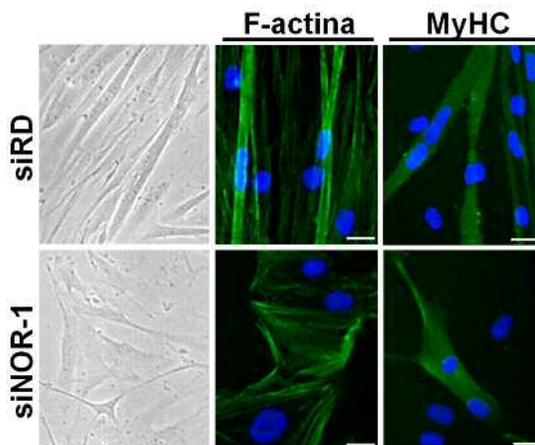


**Figura R31.** Niveles proteicos de MyHC y p27 en HSMM transfectadas con el siNOR-1 o con un siRNA control (siRD), y posteriormente cultivadas en medio de diferenciación (MD) durante cinco días. Se muestran también los niveles de estos marcadores de diferenciación en HSMM sin transfectar (-) cultivadas en MD o en medio de crecimiento (MC). Los niveles de  $\beta$ -actina se usaron como control de carga.

#### **3.7.2. NOR-1 regula la morfología celular en HSMM**

El efecto del silenciamiento de NOR-1 previo a la diferenciación sobre los niveles de MyHC también se observó mediante inmunocitoquímica de fluorescencia (Fig. R32). En las células transfectadas con el siNOR-1 se observó una menor expresión de MyHC, al comparar con las células

transfectadas con el siRNA control. La tinción del citoesqueleto de F-actina con faloidina permitió analizar el efecto del silenciamiento de NOR-1 previo a la diferenciación sobre la morfología de las HSMM (Fig. R32). Se observaron diferencias evidentes en la forma de las células transfectadas con el siNOR-1 (células mononucleadas con forma estrellada), mientras que con el siRNA control predominan las células alargadas en forma de haces y polinucleadas, característico del fenotipo diferenciado.



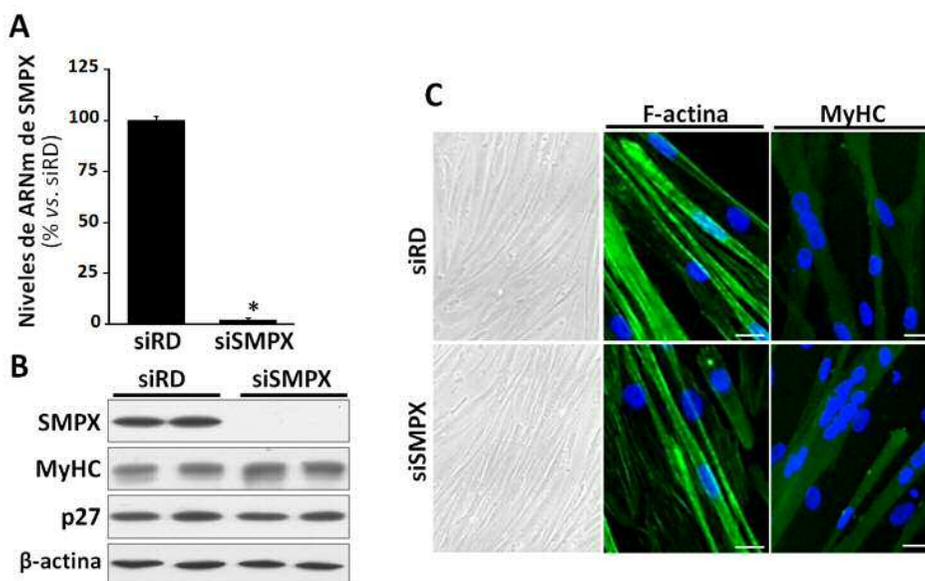
**Figura R32.** Microfotografías tomadas con luz blanca e inmunocitoquímica de fluorescencia de HSMM transfectadas con el siNOR-1 o con un siRNA control (siRD), y posteriormente cultivadas en medio de diferenciación durante cinco días. En verde se muestra la tinción de F-actina y MyHC, y en azul, los núcleos (Hoechst). Barra: 25  $\mu$ m.

### 3.7.3. El silenciamiento de SMPX no afecta a la diferenciación de HSMM

Para evaluar si el efecto de NOR-1 sobre el proceso de diferenciación y la morfología celular de HSMM implicaba a SMPX, se silenció ésta última de forma directa con un siRNA específico (siSMPX) y se incubaron las células en medio de diferenciación durante cinco días. El silenciamiento de SMPX redujo casi completamente la expresión del gen, según el análisis mediante PCR a tiempo real y *Western blot* (Fig. R33 A y B). Sin embargo, no se alteraron los niveles proteicos de ambos marcadores de diferenciación ni la

## RESULTADOS

morfología celular (Fig. R33C), analizada mediante inmunocitoquímica de fluorescencia. En este caso, la tinción de la F-actina evidenció que, a pesar de silenciar a SMPX, las células adquirieron el fenotipo característico de células diferenciadas (células alargadas y polinucleadas).

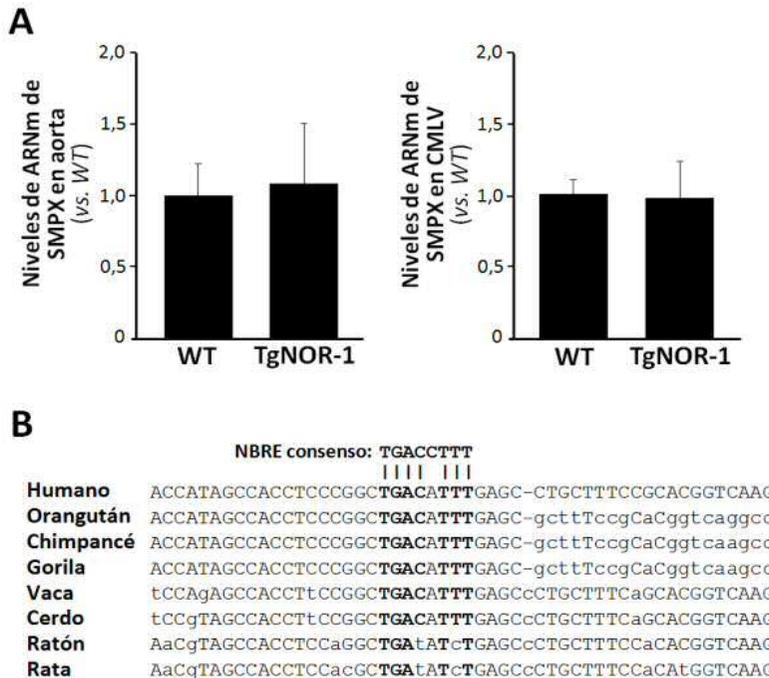


**Figura R33. (A)** Niveles de ARNm de SMPX en HSMC transfectadas con el siSMPX o con un siRNA control (siRD), y posteriormente cultivadas en medio de diferenciación durante cinco días. Los datos fueron normalizados por los niveles de TBP y se expresan como la media  $\pm$  SD ( $n=6$ ).  $p<0,05$ ; \*, vs. siRD. **(B)** Niveles proteicos de SMPX, MyHC y p27 en las células correspondientes a (A). Los niveles de  $\beta$ -actina se usaron como control de carga. **(C)** Microfotografías tomadas con luz blanca e inmunocitoquímica de fluorescencia de las células correspondientes a (A). En verde se muestra la tinción de F-actina y MyHC, y en azul, los núcleos (Hoechst). Barra: 25  $\mu$ m.

### 3.8. La expresión de SMPX no es regulada por NOR-1 en ratón

Para evaluar si la regulación de SMPX por parte de NOR-1 observada en CMLV humanas tenía lugar también en ratón, se determinaron los niveles de ARNm de este gen en aorta y CMLV de animales TgNOR-1, que sobreexpresan NOR-1 en estas células. Mediante PCR a tiempo real no se

observaron diferencias en la expresión de SMPX ni a nivel de aorta ni en los cultivos de CMLV de los animales TgNOR-1, en comparación con la aorta o con células de los animales control (Fig. R34 A).



**Figura R34. (A)** Niveles de ARNm de SMPX en aorta y en CMLV de aorta, de ratones salvajes (*WT*) y de ratones TgNOR-1 (barras negras). Los datos fueron normalizados por los niveles de TBP y se expresan como la media  $\pm$  SEM (para las muestras de aorta; n=7) o como la media  $\pm$  SD (para las muestras de CMLV; n=6). **(B)** Alineamiento múltiple de secuencias del promotor de SMPX entre varias especies, tomando como referencia el fragmento que contiene el elemento NBRE del promotor humano. En negrita se indica la conservación de bases con el elemento NBRE consenso y en mayúsculas, las bases conservadas entre especies.

Además, el alineamiento múltiple de las secuencias del promotor de SMPX de varias especies mostró que el elemento NBRE identificado en el promotor humano no está conservado en ratón ni en rata (Fig. R34 B). Por el contrario, se observó la conservación de dicho elemento en especies como el orangután, el chimpancé, el gorila, la vaca y el cerdo.



# ***DISCUSIÓN***



Los receptores NR4A, y en particular NOR-1, han sido relacionados con procesos biológicos como la supervivencia celular, la apoptosis y el metabolismo, y están implicados en patologías de gran incidencia como la obesidad, la diabetes, enfermedades cardiovasculares y el cáncer.<sup>125,130,255,256</sup>

Estos receptores están involucrados en la biología de las CMLV, células que experimentan cambios importantes en su actividad sintética, proliferativa y migratoria, en virtud de los cuales juegan un papel importante en el remodelado vascular asociado a las enfermedades cardiovasculares.<sup>184,244,245</sup>

Nuestro grupo identificó al receptor nuclear NOR-1 como un factor de transcripción implicado en la cardiopatía isquémica, sobre-expresado en lesiones ateroscleróticas de pacientes con esta patología y en lesiones intravasculares inducidas en el modelo porcino mediante angioplastia.<sup>160,179</sup>

También hemos descrito la implicación de este receptor en la proliferación de células vasculares inducida por diferentes estímulos,<sup>159,160,179</sup> y en la migración *in vitro* e *in vivo* de las células musculares lisas de la capa media.<sup>129,160,167,168</sup>

Sin embargo, hasta el momento se han descrito pocos genes regulados por esta familia de receptores. La identificación de nuevos genes regulados por NOR-1 y los demás miembros de la familia NR4A, aportaría información acerca de los mecanismos moleculares por los cuales estos receptores participan en las enfermedades cardiovasculares, y podría conducir a identificar nuevas dianas para el tratamiento y la prevención de dichas enfermedades.

En este sentido, nuestros estudios han permitido identificar a MYOM1 como gen diana de NOR-1, y caracterizar la regulación de los genes A2M y SMPX por los receptores NR4A a nivel vascular.

### 1. EFECTO DE LA SOBRE-EXPRESIÓN DE NOR-1 EN CMLV. IDENTIFICACIÓN DE MYOM1 COMO GEN DIANA DE NOR-1

Para identificar nuevos genes diana de NOR-1, hemos utilizado diferentes herramientas, como la técnica de *microarrays*, para comparar el perfil de expresión génica de CMLV que sobre-expresaban este receptor. De este modo, identificamos a MYOM1 como un gen candidato a ser regulado por NOR-1 en CMLV a través de un mecanismo de regulación transcripcional.

En estudios preliminares identificamos un conjunto de genes diferencialmente expresados en CMLV que sobre-expresaban NOR-1. Se realizó la búsqueda *in silico* de elementos NBRE en un fragmento de aproximadamente 2 kb de la región promotora proximal de los genes candidatos. De este modo se identificaron posibles elementos NBRE en 11 de los promotores analizados, algunos no totalmente conservados respecto a la secuencia NBRE consenso (AAAGGTCA o TGACCTT).<sup>143</sup> Dos de estos genes (A2M y SMPX), habían sido identificados como posibles genes regulados por los receptores NR4A.

Después de analizar la expresión diferencial por PCR a tiempo real y tras estudios de actividad transcripcional (transfecciones transitorias), se descartaron 8 de los 9 genes restantes, quedando únicamente como gen candidato MYOM1. El gen MYOM1 codifica a la miomesina 1, una proteína de aproximadamente 185 kDa que se expresa preferentemente en células de músculo esquelético y cardíaco.<sup>257-259</sup>

Estudios de actividad transcripcional realizados utilizando construcciones con deleciones y mutagénesis dirigida, determinaron que el elemento NBRE(-1070/-1063) identificado en el promotor de MYOM1 estaba implicado en la regulación por NOR-1. Ensayos de EMSA y ChIP corroboraron que la respuesta a NOR-1 tenía lugar a través de la unión de este receptor a dicho elemento. Otros estudios del promotor de la MYOM1 revelaron la presencia de sitios de unión a factores de transcripción que justifican la distribución tejido-específica de esta proteína, entre los que destacan varias cajas E y sitios de unión de MEF2.<sup>259</sup>

La miomesina 1 fue inicialmente denominada “esquelemina”<sup>257</sup> y, aunque posteriormente se ha determinado que se trata de dos proteínas ligeramente diferentes, muchos estudios emplean ambos nombres indistintamente. Ambas proteínas están codificadas por el mismo gen y son el resultado de un proceso de *splicing* diferencial.<sup>259</sup> Asociada al citoesqueleto, la miomesina 1 constituye parte estructural de los sarcómeros, a los que confiere propiedades elásticas<sup>257,258,260,261</sup> y, adicionalmente, su interacción con los dominios citoplasmáticos de las integrinas  $\alpha_{11b}\beta_3$  establece una conexión entre el citoesqueleto y el entorno extracelular.<sup>262-265</sup> En otro contexto, la miomesina 1 ha sido localizada en el núcleo, con un posible papel en la regulación génica.<sup>266</sup> Otros investigadores han renombrado a la esquelemina como *EH-myomesin*, y la describen como un marcador de miocardiopatía dilatada.<sup>267,268</sup>

Pese a los resultados que demuestran la regulación de la expresión de MYOM1 por NOR-1 a nivel de mRNA en CMLV en las que se sobre-expresó este receptor, y la confirmación de la regulación transcripcional mediante diferentes técnicas (transfecciones transitorias, EMSA y CHIP), no se consiguió detectar inequívocamente esta proteína en cultivos de CMLV con los anticuerpos comerciales disponibles. Esta limitación técnica condicionó en gran medida la obtención de resultados a nivel de proteína y por este motivo nos cuestionamos continuar con estos estudios, en tanto no disponer de mejores anticuerpos.

## **2. LOS RECEPTORES NR4A REGULAN LA ACTIVIDAD DE MMP-2 Y MMP-9 EN PARTE A TRAVÉS DE LA REGULACIÓN DE A2M**

El remodelado vascular constituye un proceso común a diversas patologías cardiovasculares como la aterosclerosis, la restenosis y el aneurisma de aorta abdominal. Este proceso, tanto a nivel fisiológico como patológico, conlleva una degradación y reorganización de la matriz extracelular (MEC) en la que participan las MMPs.<sup>269</sup> Para evitar una degradación excesiva de la MEC, la actividad de las MMPs está regulada a tres niveles: a nivel

transcripcional, a través de la regulación de su activación a partir de sus precursores zimógenos, y mediante inhibidores.<sup>270</sup> En el remodelado vascular juegan un papel importante las CMLV, que experimentan cambios en la expresión de genes, regulados por factores de transcripción, entre ellos los receptores NR4A.<sup>129,159,160,167,168,179</sup> Nuestros resultados indican que los receptores NR4A modulan la actividad MMP en las CMLV a través de diferentes mecanismos que incluyen la inducción de la A2M, anti-proteinasa que se expresa de forma relevante en distintos lechos vasculares humanos.

Para evaluar el efecto de los receptores NR4A sobre la actividad de MMP-2 y MMP-9, analizamos la actividad de ambas gelatinasas en CMLV humanas transducidas con vectores lentivirales para sobre-expresar estos receptores. Observamos una reducción marcada en la actividad gelatinasa de MMP-2 y MMP-9 en el sobrenadante de estas células, relacionada con una disminución de la expresión de MMP-2 y una reducción de los niveles proteicos de ambas gelatinasas. Los receptores NR4A se habían implicado previamente en la regulación de la actividad MMP<sup>271-273</sup> y nuestros resultados concuerdan con los descritos en ratones transgénicos que sobre-expresan Nur77 en CMLV, animales que presentan bajos niveles de expresión de MMP-2 en carótidas que han experimentado remodelado vascular.<sup>271</sup> Los estudios desarrollados por nuestro grupo confirman el papel regulador de Nur77 sobre los niveles de ARNm de MMP-2 y amplían este efecto a los demás miembros de la familia NR4A (NOR-1 y Nurr1).

Con relación al mecanismo molecular implicado, estudios previos indican que los receptores NR4A pueden inhibir la expresión génica a través de mecanismos que implican un antagonismo transcripcional con otros factores. Tal es el caso de la inhibición de MMP-1 mediada por Nurr1, observada en cartílago.<sup>272</sup> No obstante, en CMLV la regulación de la actividad MMP por los receptores NR4A parece ser más compleja. En el sobrenadante de CMLV que sobre-expresaban NOR-1, Nurr1 o Nur77, observamos una reducción en la actividad de MMP-9 a pesar de que los niveles de ARNm permanecían invariables, lo que sugería que los receptores NR4A podrían modular el procesamiento post-transcripcional o la secreción de la metaloproteínasa al medio extracelular. En este contexto, y debido a

que los inhibidores de las MMPs juegan un papel crucial en la regulación de la actividad MMP a nivel local,<sup>270</sup> analizamos los niveles de dos de los más comunes: TIMP-1 y TIMP-2. A pesar de que se ha descrito que Nur77 modula la expresión de TIMP-2 en diferentes tejidos,<sup>274</sup> ni los niveles de ARNm ni los de proteína de estos inhibidores estaban afectados en las CMLV que sobre-expresaban los receptores NR4A. Sin embargo, observamos un aumento significativo de los niveles de expresión de A2M en CMLV que sobre-expresaban los receptores NR4A. La regulación de este gen por NOR-1, Nurr1 y Nur77 fue confirmada mediante varias estrategias. La sobre-expresión de los tres receptores produjo un aumento en los niveles proteicos de A2M tanto en la monocapa como en el sobrenadante de estas células. De igual forma, el silenciamiento conjunto de NOR-1, Nurr1 y Nur77 (o de los tres receptores de forma independiente) en CMLV humanas provocó una reducción en el nivel de expresión basal de esta proteína. Nuestros resultados indican que dicha regulación tiene lugar a través de un mecanismo transcripcional y el análisis por ChIP, junto a la información obtenida en estudios de actividad transcripcional y EMSA, confirmó que el elemento NBRE identificado en el promotor de A2M(-71/-64) es el responsable de la regulación por los receptores NR4A. Estos resultados proporcionan nuevos datos acerca de la estructura del promotor de A2M, ya que se ha descrito la presencia de otros elementos de respuesta funcionales, entre los que destacan los elementos de unión de miembros de la familia STAT, que controlan la expresión del gen en diferentes tipos celulares.<sup>275</sup>

La A2M es una de las anti-proteinasas más abundantes en el plasma de los vertebrados<sup>200</sup> y se ha detectado en fibroblastos de diferentes orígenes<sup>204</sup> y en el endotelio cardíaco y de pequeños vasos.<sup>205</sup> Para evaluar la relevancia que podría tener la A2M en la vasculatura, analizamos su expresión en arterias humanas como la aorta y la arteria mamaria interna. Nuestros resultados demuestran que la A2M se expresa no sólo en la adventicia, sino también en el endotelio y en la capa media de las arterias analizadas. Según nuestro conocimiento, esta es la primera vez que se demuestra la expresión vascular de esta proteína en arterias humanas.

La A2M es un inhibidor de proteasas de amplio espectro que inactiva no sólo a MMPs, sino también a serín, cisteín y aspartil proteasas.<sup>270</sup> Por otro lado, se ha descrito que Nur77 es capaz de inducir la expresión de otros inhibidores de serín proteasas como la serpina 1 (PAI-1; inhibidor del activador del plasminógeno-1) en células endoteliales<sup>191</sup> y la serpina A3 (alfa-1 antiqumiotripsina) en células HepG2,<sup>276</sup> lo que sugiere que los receptores NR4A podrían modular de forma indirecta diversos procesos fisiológicos que pueden ir desde la fibrinólisis hasta el remodelado vascular. Por ello, evaluamos si la disminución de la actividad de MMP-2 y MMP-9 provocada por la sobre-expresión de los receptores NR4A en CMLV, podría estar relacionada con el aumento de la A2M en el sobrenadante de estas células. Tanto el bloqueo de la A2M secretada, con un anticuerpo, como la inhibición de la expresión del gen, con un siRNA específico, atenuó significativamente la reducción de la actividad gelatinasa de MMP-2 y MMP-9 provocada por la sobre-expresión de estos receptores. Este hecho demuestra que la sobre-expresión de los receptores NR4A en CMLV modula la actividad de estas MMPs al menos en parte a través del incremento de A2M.

Para determinar si la regulación de A2M por los receptores NR4A tenía lugar *in vivo*, se evaluó la expresión de este gen en la aorta y en CMLV de ratones transgénicos que sobre-expresan NOR-1 en estas células. Sin embargo, no detectamos ninguna alteración en los niveles de ARNm de A2M en la pared vascular de los ratones transgénicos ni en CMLV procedentes de estos animales, y tampoco se observaron cambios en la actividad transcripcional del promotor del gen murino al sobre-expresar NOR-1. Al comparar las secuencias de los promotores humano y de ratón, se observó que el elemento NBRE responsable de la respuesta a los receptores NR4A no estaba conservado en ratón, hecho que podría explicar las divergencias detectadas entre ambas especies. No obstante, tras el tratamiento de los ratones TgNOR-1 con LPS, se observó que la inducción de la expresión de MMP-2 y MMP-9 en la aorta estaba considerablemente atenuada, lo que confirma la capacidad de los receptores NR4A de regular *in vivo* la expresión de ambas gelatinasas. Estos resultados sugieren que, en ratón, la A2M no estaría implicada en la regulación de MMP-2 y MMP-9 mediada por los

receptores NR4A. Estos receptores nucleares presentan actividad anti-inflamatoria en CMLV debida a la interferencia con la vía de NFκB,<sup>277</sup> mecanismo que podría contribuir a la regulación de estas MMPs por los receptores NR4A.<sup>104,105,192</sup>

Aunque nuestros resultados están acorde con el papel fisiológico de la A2M, la inhibición de MMPs constituye tan sólo una parte de las diversas funciones de esta proteína. Su papel principal es el secuestro físico de las proteinasas, lo que sitúa a la A2M en la regulación de la actividad proteolítica extracelular implicada en la coagulación y la fibrinólisis.<sup>200</sup> También se ha descrito su participación en la contención y regulación de eventos inflamatorios al modular la actividad proteasa y actuar como un *scavenger* de las defensinas y de otros péptidos mediadores de la inflamación.<sup>200</sup> Se ha descrito además que la A2M se une a diversas citoquinas inflamatorias, también presentes durante los procesos de reparación de heridas, evitando la unión de estas moléculas a sus receptores correspondientes.<sup>200</sup> Todo ello sugiere que las consecuencias de la regulación de A2M por los receptores NR4A en CMLV podrían ir más allá de la inhibición de la actividad MMP y afectar múltiples aspectos de la fisiopatología cardiovascular.

### **3. NOR-1 REGULA LA EXPRESIÓN DE SMPX Y LA DIFERENCIACIÓN DE MIOBLASTOS DE MÚSCULO ESQUELÉTICO HUMANO**

El receptor nuclear NOR-1 ha sido relacionado con la regulación de diversos procesos (a veces antagónicos) como la supervivencia celular y la apoptosis, o la proliferación y la diferenciación celular,<sup>125,130</sup> y presenta un patrón de expresión que varía dependiendo del tejido.<sup>147,148,160,278</sup> La respuesta temprana de NOR-1 frente a citoquinas y factores de crecimiento ha sido asociada con la proliferación y migración de las CMLV,<sup>159-163,179</sup> mientras que en el músculo esquelético la expresión de este receptor se induce por la actividad contráctil del músculo<sup>195,279,280</sup> y ha sido relacionada con hipertrofia muscular.<sup>193,281</sup> Dado el papel de NOR-1 en el metabolismo lipídico y

## **DISCUSIÓN**

---

glucídico, se ha propuesto a este receptor como un nexo entre el rendimiento muscular y la capacidad metabólica,<sup>196,199</sup> aunque se han descrito relativamente pocos genes diana relacionados con estas funciones. Nuestros resultados reconocen a SMPX como un gen diana de NOR-1 en CMLV y HSMM, e indican que este receptor nuclear regula la diferenciación de mioblastos de músculo esquelético humano de forma independiente a la SMPX.

Con el objetivo de identificar genes diana de NOR-1, se sobre-expresó de forma estable este receptor en CMLV mediante transducción lentiviral. La expresión sostenida de NOR-1 dio lugar a células morfológicamente diferentes, con una actividad proliferativa significativamente inferior y signos de hipertrofia celular. Aunque se desconoce el papel específico de NOR-1 en la hipertrofia celular, nuestros resultados son coherentes con la regulación negativa de la miostatina (proteína anti-hipertrófica)<sup>282</sup> por este receptor en la línea celular de mioblastos de músculo esquelético de ratón C2C12.<sup>193</sup> Análogamente, la expresión de miostatina disminuye en un modelo de ratón transgénico que sobre-expresa Nurr77 en músculo esquelético.<sup>283</sup>

Los cambios en el fenotipo y la morfología celular están acompañados frecuentemente por alteraciones importantes en el patrón de expresión génica, afectando al citoesqueleto y a proteínas asociadas a éste. Como primera aproximación, analizamos los niveles de ARNm de un conjunto de genes relacionados con la morfología celular. A pesar de los cambios evidentes en el reordenamiento de los filamentos de actina provocados por la sobre-expresión de NOR-1 en estas células, no se observaron diferencias en los niveles de ARNm de los genes ACTB y ACTA2, que codifican para la  $\beta$ - y  $\alpha$ -actina, respectivamente. Sin embargo, la sobre-expresión de NOR-1 aumentó en gran medida la expresión de SMPX y de uno de los transcritos codificados por el gen CALD1, correspondiente a la variante proteica más ampliamente expresada (I-CaD).

Debido a que NOR-1 modula la transcripción a través de su unión a elementos NBRE presentes en la región promotora de sus genes diana,<sup>119,143</sup>

analizamos los promotores de CALD1 y SMPX en busca de elementos de respuesta a NOR-1. El análisis *in silico* sólo identificó posibles elementos NBRE en el promotor de SMPX. Mediante diferentes estrategias, que incluyeron ensayos de CHIP, determinamos que la regulación de la expresión de este gen mediada por NOR-1 tiene lugar a través de la unión de este factor de transcripción a un NBRE no consenso (5'-AAATGTCA-3'), no descrito anteriormente y localizado entre las posiciones -167 y -160 respecto al inicio de transcripción del gen. Hasta el momento, en el promotor de SMPX habían sido identificados posibles sitios de unión a diferentes factores de transcripción específicos de tejido muscular, entre ellos MEF-2, MyoD, E47, RSRFC4 y Nkx-2.5, implicados en el control de la miogénesis del músculo esquelético y en la formación y desarrollo del miocardio.<sup>239</sup> Por tanto, nuestros resultados permiten profundizar en los mecanismos implicados en la regulación transcripcional de la SMPX.

El gen SMPX codifica para una proteína pequeña de 9 kDa muy conservada en mamíferos.<sup>234</sup> Aunque la función celular de esta proteína no está clara, parece participar en la reorganización del citoesqueleto.<sup>234</sup> La sobreexpresión de SMPX en células C2C12 induce la formación de lamelipodia, y en estas estructuras colocaliza con proteínas asociadas a las adhesiones focales, sugiriendo una posible interacción con la vía de las integrinas.<sup>235</sup> La SMPX fue identificada por primera vez como una proteína que se expresa selectivamente en células humanas cardíacas y de músculo esquelético.<sup>233</sup> El análisis de la expresión de SMPX en diferentes tejidos de ratón confirma dicho patrón. Asimismo, el perfil de expresión de este gen en muestras humanas fue similar, con una elevada expresión en músculo esquelético en comparación con los distintos lechos vasculares analizados, detectando expresión de SMPX en la arteria coronaria y la aorta. La expresión de SMPX en vasos humanos no había sido reportada hasta el momento. En otras especies de mamíferos se habían detectado bajos niveles de ARNm en tejidos y órganos ricos en músculo liso como en el estómago y el intestino de cerdo,<sup>240</sup> y también en el estómago y las venas pulmonares de ratón.<sup>234</sup>

Tras los estudios de sobreexpresión y para corroborar de forma fehaciente que NOR-1 regula la expresión de SMPX, se realizaron estudios de

silenciamiento. Debido a la baja expresión basal de este gen en las CMLV, los ensayos se llevaron a cabo en las HSMM, células procedentes de músculo esquelético humano que, según nuestros resultados, presentan niveles de ARNm de SMPX casi 800 veces superiores a las CMLV. Observamos que el silenciamiento de NOR-1 con un siRNA específico redujo de forma significativa los niveles de SMPX, lo que confirma la regulación por NOR-1.

Los ensayos en HSMM permitieron evaluar el papel de NOR-1 y SMPX en el proceso de diferenciación de estas células. Observamos que, al diferenciar las HSMM a miotubos (miogénesis), aumentaban significativamente los niveles de expresión de NOR-1 y SMPX. En concordancia, la diferenciación de células C2C12 a miotubos también cursa con un incremento de la expresión de NOR-1.<sup>193</sup> Sin embargo, el incremento de los niveles de SMPX como consecuencia de la diferenciación de mioblastos a miotubos no había sido reportado previamente.

Para determinar si el incremento de SMPX observado en HSMM diferenciadas estaba mediado por NOR-1, se silenció este receptor antes de inducir la diferenciación. Esta estrategia suprimió el incremento en los niveles de la SMPX desencadenado por la diferenciación a miotubos. Los estudios de CHIP realizados en estas células, mostraron que el bloqueo de la expresión de NOR-1 disminuyó la unión de este receptor nuclear al elemento NBRE(-167/-160) del promotor de SMPX. Estos análisis determinaron además que NOR-1 es necesario para la diferenciación de las HSMM, ya que su deficiencia previno el aumento de la expresión de los marcadores de diferenciación p27 (marcador temprano) y MyHC (marcador tardío) y los cambios morfológicos característicos del fenotipo diferenciado.<sup>241</sup>

Frente a los contundentes resultados que el bloqueo de la expresión de NOR-1 provocó a la diferenciación, el silenciamiento de SMPX no modificó la expresión de los marcadores de diferenciación ni alteró la morfología celular, hecho que sugiere que el efecto de NOR-1 sobre la diferenciación de las HSMM es independiente de la expresión de la SMPX y que ésta última no juega un papel relevante en este proceso. Estos datos están en aparente contradicción con los obtenidos en células C2C12, donde la sobre-expresión

de SMPX altera la dinámica del citoesqueleto y la forma celular, y promueve la fusión de los miocitos.<sup>234,235</sup> Los autores proponen una posible implicación de la SMPX en la regulación de las células musculares durante el crecimiento, la adaptación y la reparación.<sup>234</sup> Sin embargo, se desconoce el papel específico de la SMPX en estos procesos.

La contribución de NOR-1 a la regulación de SMPX *in vivo*, se analizó en la aorta y en CMLV de ratones transgénicos que sobre-expresan NOR-1 en estas células. Sin embargo, la expresión de la SMPX no se alteró ni en la pared vascular de los ratones TgNOR-1 ni en las CMLV de la aorta de estos animales. El análisis *in silico* del promotor de SMPX en distintas especies mostró que el elemento NBRE responsable de la respuesta a NOR-1 en el promotor humano no estaba conservado en roedores como ratón y rata, lo que explicaría las discrepancias observadas entre especies. Por tanto, y desafortunadamente, estos resultados descartan la posibilidad de emplear este modelo animal para el estudio de la modulación de SMPX por NOR-1.

Nuestros resultados describen a SMPX como gen diana de NOR-1 en células humanas e implican a este receptor nuclear en la diferenciación de mioblastos de músculo esquelético. En este contexto, NOR-1 parece complementar la acción de otros factores de transcripción que, de forma coordinada, participan en la regulación de la diferenciación celular.<sup>196</sup> Sin embargo, se requieren más estudios para establecer la relevancia de este factor de transcripción en la biología del músculo esquelético humano.



# ***CONCLUSIONES***



**Los resultados obtenidos en este estudio permiten llegar a las siguientes conclusiones:**

Con relación al primer objetivo:

- MYOM1 es un gen diana de NOR-1 en CMLV humanas.
- NOR-1 regula la expresión de MYOM1 a través de un elemento NBRE presente en su región promotora.

Con relación al segundo objetivo:

- La sobre-expresión de los receptores NR4A reduce la actividad de MMP-2 y MMP-9 a través de varios mecanismos, entre ellos el incremento en la expresión de la A2M y la reducción en los niveles proteicos de ambas metaloproteinasas.
- Los receptores NR4A regulan la expresión de A2M mediante la unión a un elemento NBRE situado en la región promotora proximal de este gen.
- La A2M se expresa en arterias humanas, principalmente en las CMLV de la capa media.
- La sobre-expresión de NOR-1 en un modelo de ratón transgénico atenúa la expresión de MMP-2 y MMP-9 inducida por estímulos inflamatorios.
- El gen de la A2M murina no es sensible a la regulación por NOR-1.

Con relación al tercer objetivo:

- La sobre-expresión de NOR-1 en CMLV humanas afecta a la forma celular y disminuye la tasa de proliferación de estas células.
- NOR-1 regula al gen SMPX en CMLV y HSMM a través de un elemento de respuesta NBRE no canónico.
- La diferenciación de HSMM a miotubos incrementa la expresión y los niveles proteicos de SMPX de forma dependiente de NOR-1.
- El silenciamiento de NOR-1 inhibe la diferenciación de las HSMM, proceso en el que la SMPX no parece jugar un papel relevante.
- El gen de la SMPX murina no es sensible a la regulación por NOR-1.



# ***BIBLIOGRAFÍA***



1. Fuster, V., Badimon, L., Badimon, J. J. & Chesebro, J. H. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1). *N. Engl. J. Med.* **326**, 242–50 (1992).
2. Ross, R. Atherosclerosis An Inflammatory Disease. *N. Engl. J. Med.* **340**, 115–126 (1999).
3. Mayerl, C. *et al.* Atherosclerosis research from past to present - On the track of two pathologists with opposing views, Carl von Rokitansky and Rudolf Virchow. *Virchows Arch.* **449**, 96–103 (2006).
4. Lahoz, C. & Mostaza, J. M. La Aterosclerosis como enfermedad sistémica. *Rev. Española Cardiol.* **60**, 184–195 (2007).
5. Lusis, A. J. Atherosclerosis. *Nature* **407**, 233–41 (2000).
6. Orbay, H., Hong, H., Zhang, Y. & Cai, W. Positron emission tomography imaging of atherosclerosis. *Theranostics* **3**, 894–902 (2013).
7. Vane, J. R., Ånggård, E. E. & Botting, R. M. Regulatory Functions of the Vascular Endothelium. *N. Engl. J. Med.* **323**, 27–36 (1990).
8. Davignon, J. & Ganz, P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* **109**, III27–32 (2004).
9. Vanhoutte, P. M. Endothelial dysfunction and atherosclerosis. in *European Heart Journal* **18**, (1997).
10. Borén, J. *et al.* Identification of the principal proteoglycan-binding site in LDL: A single-point mutation in apo-B100 severely affects proteoglycan interaction without affecting LDL receptor binding. *J. Clin. Invest.* **101**, 2658–2664 (1998).
11. Collins, R. G. *et al.* P-Selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *The Journal of experimental medicine* **191**, 189–94 (2000).
12. Dong, Z. M. *et al.* The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. *J. Clin. Invest.* **102**, 145–152 (1998).
13. Boisvert, W. A. The participation of chemokines in atherosclerosis. *Discov. Med.* **4**, 288–92 (2004).
14. Rajavashisth, T. B. *et al.* Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins. *Nature* **344**, 254–7 (1990).
15. Peiser, L., Mukhopadhyay, S. & Gordon, S. Scavenger receptors in innate immunity. *Current Opinion in Immunology* **14**, 123–128 (2002).
16. Suzuki, H. *et al.* A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature* **386**, 292–296 (1997).
17. Febbraio, M. *et al.* Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. *J Clin Invest* **105**, 1049–1056 (2000).
18. Lacolley, P., Regnault, V., Nicoletti, A., Li, Z. & Michel, J. B. The vascular smooth muscle cell in arterial pathology: A cell that can take on multiple roles. *Cardiovascular Research*

- 95**, 194–204 (2012).
19. Holifield, B. *et al.* Differentiated vascular myocytes: Are they involved in neointimal formation? *J. Clin. Invest.* **97**, 814–825 (1996).
  20. Rzcudlo, E. M., Martin, K. A. & Powell, R. J. Regulation of vascular smooth muscle cell differentiation. *J. Vasc. Surg.* **45**, 25–32 (2007).
  21. Doran, A. C., Meller, N. & McNamara, C. A. Role of smooth muscle cells in the initiation and early progression of atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **28**, 812–819 (2008).
  22. Rudijanto, A. The role of vascular smooth muscle cells on the pathogenesis of atherosclerosis. *Acta Med Indones* **39**, 86–93 (2007).
  23. Gerhard, G. T. & Duell, P. B. Homocysteine and atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* **10**, 417–28 (1999).
  24. Qiao, C., Zhang, K. & Xia, J. Influence of oxidized low density lipoprotein on the proliferation of human artery smooth muscle cells in vitro. *J. Huazhong. Univ. Sci. Technol. Med. Sci.* **27**, 20–23 (2007).
  25. Satoh, K., Nigro, P. & Berk, B. C. Oxidative stress and vascular smooth muscle cell growth: a mechanistic linkage by cyclophilin A. *Antioxid Redox Signal* **12**, 675–682 (2010).
  26. Nelson, P. R., Yamamura, S. & Kent, K. C. Extracellular matrix proteins are potent agonists of human smooth muscle cell migration. *J. Vasc. Surg.* **24**, 25–33 (1996).
  27. Yanagi, H., Sasaguri, Y., Sugama, K., Morimatsu, M. & Nagase, H. Production of tissue collagenase (matrix metalloproteinase 1) by human aortic smooth muscle cells in response to platelet-derived growth factor. *Atherosclerosis* **91**, 207–216 (1991).
  28. Rodriguez, J. A. *et al.* Metalloproteinases and atherothrombosis: MMP-10 mediates vascular remodeling promoted by inflammatory stimuli. *Front Biosci* **13**, 2916–2921 (2008).
  29. Orbe, J. *et al.* Matrix metalloproteinase-10 is upregulated by thrombin in endothelial cells and increased in patients with enhanced thrombin generation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **29**, 2109–2116 (2009).
  30. Cai, Q., Lanting, L. & Natarajan, R. Interaction of monocytes with vascular smooth muscle cells regulates monocyte survival and differentiation through distinct pathways. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 2263–2270 (2004).
  31. Llorente-Cortés, V., Martínez-González, J. & Badimon, L. LDL receptor-related protein mediates uptake of aggregated LDL in human vascular smooth muscle cells. *Arter. Thromb Vasc Biol* **20**, 1572–1579 (2000).
  32. Llorente-Cortés, V., Otero-Viñas, M., Hurt-Camejo, E., Martínez-González, J. & Badimon, L. Human coronary smooth muscle cells internalize versican-modified LDL through LDL receptor-related protein and LDL receptors. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **22**, 387–393 (2002).
  33. Matsumoto, K. *et al.* Expression of macrophage (Mphi) scavenger receptor, CD36, in cultured human aortic smooth muscle cells in association with expression of peroxisome proliferator activated receptor-gamma, which regulates gain of Mphi-like phenotype in

- vitro, and its implic. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20**, 1027–32 (2000).
34. Watkins, H. & Farrall, M. Genetic susceptibility to coronary artery disease: from promise to progress. *Nat. Rev. Genet.* **7**, 163–173 (2006).
  35. Lee, R. T. & Libby, P. The unstable atheroma. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **17**, 1859–1867 (1997).
  36. Katsuda, S. & Kaji, T. Atherosclerosis and extracellular matrix. *J. Atheroscler. Thromb.* **10**, 267–274 (2003).
  37. Dhume, A. S. & Agrawal, D. K. Inability of vascular smooth muscle cells to proceed beyond S phase of cell cycle, and increased apoptosis in symptomatic carotid artery disease. *J Vasc Surg* **38**, 155–161 (2003).
  38. Clarke, M. C. H. *et al.* Apoptosis of vascular smooth muscle cells induces features of plaque vulnerability in atherosclerosis. *Nat. Med.* **12**, 1075–1080 (2006).
  39. Clarke, M. C. H. *et al.* Chronic apoptosis of vascular smooth muscle cells accelerates atherosclerosis and promotes calcification and medial degeneration. *Circ. Res.* **102**, 1529–1538 (2008).
  40. Bjornheden, T., Levin, M., Evaldsson, M. & Wiklund, O. Evidence of Hypoxic Areas Within the Arterial Wall In Vivo. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **19**, 870–876 (1999).
  41. Silvola, J. M. U. *et al.* Detection of hypoxia by [18F]EF5 in atherosclerotic plaques in mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 1011–1015 (2011).
  42. Sluimer, J. C. *et al.* Hypoxia, Hypoxia-Inducible Transcription Factor, and Macrophages in Human Atherosclerotic Plaques Are Correlated With Intraplaque Angiogenesis. *J. Am. Coll. Cardiol.* **51**, 1258–1265 (2008).
  43. Kockx, M. M. *et al.* Phagocytosis and macrophage activation associated with hemorrhagic microvessels in human atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **23**, 440–446 (2003).
  44. Guzman, R. J. Clinical, cellular, and molecular aspects of arterial calcification. *J. Vasc. Surg.* **45**, 57–63 (2007).
  45. Shao, J. S., Cai, J. & Towler, D. A. Molecular mechanisms of vascular calcification: Lessons learned from the aorta. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **26**, 1423–1430 (2006).
  46. Liberman, M., Pesaro, a E., Carmo, L. S. & Serrano Jr, C. V. Vascular calcification: pathophysiology and clinical implications. *Einstein (Sao Paulo)* **11**, 376–382 (2013).
  47. Olefsky, J. M. Nuclear receptor minireview series. *J. Biol. Chem.* **276**, 36863–4 (2001).
  48. Laudet, V. Evolution of the nuclear receptor superfamily: Early diversification from an ancestral orphan receptor. *J. Mol. Endocrinol.* **19**, 207–226 (1997).
  49. Jensen, E. V. On the Mechanism of Estrogen Action. *Perspect. Biol. Med.* **6**, 47–60 (1962).
  50. Hollenberg, S. M. *et al.* Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature* **318**, 635–41 (1985).
  51. Green, S. *et al.* Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to

- v-erb-A. *Nature* **320**, 134–9 (1986).
52. Conneely, O. M. *et al.* Molecular cloning of the chicken progesterone receptor. *Science* **233**, 767–70 (1986).
53. Weinberger, C. *et al.* The c-erb-A gene encodes a thyroid hormone receptor. *Nature* **324**, 641–646 (1986).
54. Petkovich, M., Brand, N. J., Krust, A. & Chambon, P. A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. *Nature* **330**, 444–450 (1987).
55. McDonnell, D., Mangelsdorf, D., Pike, J., Haussler, M. & O'Malley, B. Molecular cloning of complementary DNA encoding the avian receptor for vitamin D. *Science* (80- ). **235**, 1214–1217 (1987).
56. Arriza, J. L. *et al.* Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science* **237**, 268–275 (1987).
57. Lubahn, D. B. *et al.* Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromosome. *Science* (80- ). **240**, 327–330 (1988).
58. Chang, C. S., Kokontis, J. & Liao, S. T. Molecular cloning of human and rat complementary DNA encoding androgen receptors. *Science* (80- ). **240**, 324–326 (1988).
59. Benoit, G. *et al.* International Union of Pharmacology. LXVI. Orphan Nuclear Receptors. *Pharmacol. Rev.* **58**, 798–836 (2006).
60. Mangelsdorf, D. J. *et al.* The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* **83**, 835–839 (1995).
61. Aranda, A. & Pascual, A. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev* **81**, 1269–1304 (2001).
62. Laudet, V. Evolution of the nuclear receptor superfamily: Early diversification from an ancestral orphan receptor. *Journal of Molecular Endocrinology* **19**, 207–226 (1997).
63. Willson, T. M., Brown, P. J., Sternbach, D. D. & Henke, B. R. The PPARs: From orphan receptors to drug discovery. *Journal of Medicinal Chemistry* **43**, 527–550 (2000).
64. Escriva, H., Bertrand, S. & Laudet, V. The evolution of the nuclear receptor superfamily. *Essays Biochem* **40**, 11–26 (2004).
65. Nuclear Receptors Nomenclature Committee. A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell* **97**, 161–163 (1999).
66. Wärnmark, A., Treuter, E., Wright, A. P. H. & Gustafsson, J.-Å. Activation Functions 1 and 2 of Nuclear Receptors: Molecular Strategies for Transcriptional Activation. *Mol. Endocrinol.* **17**, 1901–1909 (2003).
67. Chen, J. D. & Evans, R. M. A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* **377**, 454–457 (1995).
68. Hörlein, a J. *et al.* Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* **377**, 397–404 (1995).
69. Moras, D. & Gronemeyer, H. The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and

- function. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 384–391 (1998).
70. Bourguet, W., Germain, P. & Gronemeyer, H. Nuclear receptor ligand-binding domains: Three-dimensional structures, molecular interactions and pharmacological implications. *Trends in Pharmacological Sciences* **21**, 381–388 (2000).
  71. Uppenberg, J. *et al.* Crystal structure of the ligand binding domain of the human nuclear receptor PPARgamma. *J Biol Chem* **273**, 31108–31112 (1998).
  72. Sladek, F. M., Ruse, M. D., Nepomuceno, L., Huang, S. M. & Stallcup, M. R. Modulation of transcriptional activation and coactivator interaction by a splicing variation in the F domain of nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4alpha1. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 6509–22 (1999).
  73. Dostert, a & Heinzl, T. Negative glucocorticoid receptor response elements and their role in glucocorticoid action. *Curr. Pharm. Des.* **10**, 2807–16 (2004).
  74. Chandran, U. R. *et al.* Glucocorticoid repression of the mouse gonadotropin-releasing hormone gene is mediated by promoter elements that are recognized by heteromeric complexes containing glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* **271**, 20412–20420 (1996).
  75. Chatterjee, V. K. K., Lee, J.-K., Rentoumis, A. & Jameson, J. L. Negative regulation of the thyroid-stimulating hormone alpha gene by thyroid hormone: receptor interaction adjacent to the TATA box. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 9114–9118 (1989).
  76. Villa, A., Santiago, J., Belandia, B. & Pascual, A. A response unit in the first exon of the beta-amyloid precursor protein gene containing thyroid hormone receptor and Sp1 binding sites mediates negative regulation by 3,5,3'-triiodothyronine. *Mol. Endocrinol.* **18**, 863–73 (2004).
  77. Sakai, D. D. *et al.* Hormone-mediated repression: a negative glucocorticoid response element from the bovine prolactin gene. *Genes Dev.* **2**, 1144–1154 (1988).
  78. Verrijzer, C. P. & Tjian, R. TAFs mediate transcriptional activation and promoter selectivity. *Trends in Biochemical Sciences* **21**, 338–342 (1996).
  79. Klein-Hitpass, L., Schwerk, C., Kahmann, S. & Vaßen, L. Targets of activated steroid hormone receptors: Basal transcription factors and receptor interacting proteins. *Journal of Molecular Medicine* **76**, 490–496 (1998).
  80. Glass, C. K. & Rosenfeld, M. G. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes and Development* **14**, 121–141 (2000).
  81. Dilworth, F. J. & Chambon, P. Nuclear receptors coordinate the activities of chromatin remodeling complexes and coactivators to facilitate initiation of transcription. *Oncogene* **20**, 3047–3054 (2001).
  82. Onate, S. A., Tsai, S. Y., Tsai, M. J. & O'Malley, B. W. Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science (80-. )*. **270**, 1354–1357 (1995).
  83. Szwarc, M. M., Kommagani, R., Lessey, B. A. & Lydon, J. P. The p160/steroid receptor coactivator family: potent arbiters of uterine physiology and dysfunction. *Biol. Reprod.* **91**, 122 (2014).
  84. Bannister, A. J. & Kouzarides, T. The CBP co-activator is a histone acetyltransferase.

- Nature* **384**, 641–3 (1996).
85. Puigserver, P. *et al.* Activation of PPARgamma coactivator 1 through transcription factor docking. *Science (80-. )*. **286**, 1368–1371 (1999).
  86. Fondell, J. D., Ge, H. & Roeder, R. G. Ligand induction of a transcriptionally active thyroid hormone receptor coactivator complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 8329–33 (1996).
  87. Rachez, C. *et al.* A novel protein complex that interacts with the vitamin D3 receptor in a ligand-dependent manner and enhances VDR transactivation in a cell-free system. *Genes Dev.* **12**, 1787–1800 (1998).
  88. Nawaz, Z., Lonard, D. M., Dennis, a P., Smith, C. L. & O'Malley, B. W. Proteasome-dependent degradation of the human estrogen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 1858–1862 (1999).
  89. Fryer, C. J. & Archer, T. K. Chromatin remodelling by the glucocorticoid receptor requires the BRG1 complex. *Nature* **393**, 88–91 (1998).
  90. Koh, S. S., Chen, D., Lee, Y. H. & Stallcup, M. R. Synergistic enhancement of nuclear receptor function by p160 coactivators and two coactivators with protein methyltransferase activities. *J. Biol. Chem.* **276**, 1089–1098 (2001).
  91. Lanz, R. B. *et al.* A steroid receptor coactivator, SRA, functions as an RNA and is present in an SRC-1 complex. *Cell* **97**, 17–27 (1999).
  92. Miyata, K. S. *et al.* Receptor-interacting protein 140 interacts with and inhibits transactivation by, peroxisome proliferator-activated receptor alpha and liver- X-receptor alpha *Mol. Cell. Endocrinol.* **146**, 69–76 (1998).
  93. White, J. H., Fernandes, I., Mader, S. & Yang, X. J. Corepressor Recruitment by Agonist-Bound Nuclear Receptors. *Vitam. Horm.* **68**, 123–143 (2004).
  94. Diamond, M., Miner, J., Yoshinaga, S. & Yamamoto, K. Transcription factor interactions: selectors of positive or negative regulation from a single DNA element. *Science (80-. )*. **249**, 1266–1272 (1990).
  95. Schüle, R. *et al.* Jun-Fos and receptors for vitamins A and D recognize a common response element in the human osteocalcin gene. *Cell* **61**, 497–504 (1990).
  96. Paech, K. *et al.* Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. *Science* **277**, 1508–1510 (1997).
  97. Webb, P., Lopez, G. N., Uht, R. M. & Kushner, P. J. Tamoxifen activation of the estrogen receptor/AP-1 pathway: potential origin for the cell-specific estrogen-like effects of antiestrogens. *Mol. Endocrinol.* **9**, 443–456 (1995).
  98. Sheppard, K. a *et al.* Nuclear integration of glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB signaling by CREB-binding protein and steroid receptor coactivator-1. *J. Biol. Chem.* **273**, 29291–29294 (1998).
  99. Ray, A. & Prefontaine, K. E. Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF-kappa B and the glucocorticoid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 752–756 (1994).
  100. Auphan, N., DiDonato, J. A., Rosette, C., Helmborg, A. & Karin, M. Immunosuppression by

- Glucocorticoids: Inhibition of NF-kappaB Activity Through Induction of IkappaB Synthesis. *Science* (80-. ). **270**, 286–290 (1995).
101. Schouten, G. J., van der Eb, A. J. & Zantema, A. Downregulation of MHC class I expression due to interference with p105-NF kappa B1 processing by Ad12E1A. *EMBO J.* **14**, 1498–507 (1995).
  102. Kalaitzidis, D. & Gilmore, T. D. Transcription factor cross-talk: the estrogen receptor and NF-kappaB. *Trends Endocrinol. Metab.* **16**, 46–52 (2005).
  103. McKay, L. I. & Cidlowski, J. A. Cross-talk between nuclear factor-kappa B and the steroid hormone receptors: mechanisms of mutual antagonism. *Mol. Endocrinol.* **12**, 45–56 (1998).
  104. Harant, H. & Lindley, I. J. D. Negative cross-talk between the human orphan nuclear receptor Nur77/NAK-1/TR3 and nuclear factor-??B. *Nucleic Acids Res.* **32**, 5280–5290 (2004).
  105. Saijo, K. *et al.* A Nurr1/CoREST Pathway in Microglia and Astrocytes Protects Dopaminergic Neurons from Inflammation-Induced Death. *Cell* **137**, 47–59 (2009).
  106. Calvayrac, O., Rodríguez-Calvo, R., Martí-Pàmies, I., Alonso, J., Ferrán, B., Aguiló, S., Crespo, J., Rodríguez-Sinovas, A., Rodríguez, C., Martínez-González J. NOR-1 modulates the inflammatory response of vascular smooth muscle cells by preventing NFkB activation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **80**, 34–44 (2014).
  107. Schüle, R. & Evans, R. M. Cross-coupling of signal transduction pathways: zinc finger meets leucine zipper. *Trends in Genetics* **7**, 377–381 (1991).
  108. Jonat, C. *et al.* Antitumor promotion and antiinflammation: Down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell* **62**, 1189–1204 (1990).
  109. Yang-Yen, H. F. *et al.* Transcriptional interference between c-Jun and the glucocorticoid receptor: Mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction. *Cell* **62**, 1205–1215 (1990).
  110. Doucas, V., Spyrou, G. & Yaniv, M. Unregulated expression of c-Jun or c-Fos proteins but not Jun D inhibits oestrogen receptor activity in human breast cancer derived cells. *EMBO J.* **10**, 2237–45 (1991).
  111. Nicholson, R. C. *et al.* Negative regulation of the rat stromelysin gene promoter by retinoic acid is mediated by an AP1 binding site. *EMBO J.* **9**, 4443–54 (1990).
  112. Zhang, X. K., Wills, K. N., Husmann, M., Hermann, T. & Pfahl, M. Novel pathway for thyroid hormone receptor action through interaction with jun and fos oncogene activities. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 6016–25 (1991).
  113. Palomino, T., Sanchez-Pacheco, A., Pena, P. & Aranda, A. A direct protein-protein interaction is involved in the cooperation between thyroid hormone and retinoic acid receptors and the transcription factor GHF-1. *Faseb J* **12**, 1201–1209 (1998).
  114. Castillo, A. I., Jimenez-Lara, A. M., Tolon, R. M. & Aranda, A. Synergistic activation of the prolactin promoter by vitamin D receptor and GHF-1: role of the coactivators, CREB-binding protein and steroid hormone receptor coactivator-1 (SRC-1). *Mol. Endocrinol.* **13**, 1141–54 (1999).

115. Bruggemeier, U., Kalff, M., Franke, S., Scheidereit, C. & Beato, M. Ubiquitous transcription factor OTF-1 mediates induction of the MMTV promoter through synergistic interaction with hormone receptors. *Cell* **64**, 565–572 (1991).
116. Hazel, T. G., Nathans, D. & Lau, L. F. A gene inducible by serum growth factors encodes a member of the steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 8444–8448 (1988).
117. Milbrandt, J. Nerve growth factor induces a gene homologous to the glucocorticoid receptor gene. *Neuron* **1**, 183–188 (1988).
118. Law, S. W., Conneely, O. M., DeMayo, F. J. & O'Malley, B. W. Identification of a new brain-specific transcription factor, NURR1. *Mol. Endocrinol.* **6**, 2129–35 (1992).
119. Ohkura, N., Hijikuro, M., Yamamoto, A. & Miki, K. Molecular cloning of a novel thyroid/steroid receptor superfamily gene from cultured rat neuronal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **205**, 1959–1965 (1994).
120. Hedvat, C. V & Irving, S. G. The isolation and characterization of MINOR, a novel mitogen-inducible nuclear orphan receptor. *Mol Endocrinol* **9**, 1692–1700 (1995).
121. Maxwell, M. a & Muscat, G. E. O. The NR4A subgroup: immediate early response genes with pleiotropic physiological roles. *Nucl. Recept. Signal.* **4**, e002 (2006).
122. Li, Y. & Lau, L. F. Adrenocorticotrop hormone regulates the activities of the orphan nuclear receptor Nur77 through modulation of phosphorylation. *Endocrinology* **138**, 4138–4146 (1997).
123. Arredondo, C. *et al.* PIASy enhanced SUMO-2 modification of Nurr1 activation-function-1 domain limits Nurr1 transcriptional synergy. *PLoS One* **8**, e55035 (2013).
124. Fahrner, T. J., Carroll, S. L. & Milbrandt, J. The NGFI-B protein, an inducible member of the thyroid/steroid receptor family, is rapidly modified posttranslationally. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 6454–6459 (1990).
125. Martínez-González, J. & Badimon, L. The NR4A subfamily of nuclear receptors: New early genes regulated by growth factors in vascular cells. *Cardiovasc. Res.* **65**, 609–618 (2005).
126. Pei, L., Castrillo, A., Chen, M., Hoffmann, A. & Tontonoz, P. Induction of NR4A orphan nuclear receptor expression in macrophages in response to inflammatory stimuli. *J. Biol. Chem.* **280**, 29256–29262 (2005).
127. Bandoh, S., Tsukada, T., Maruyama, K., Ohkura, N. & Yamaguchi, K. Mechanical agitation induces gene expression of {NOR}-1 and its closely related orphan nuclear receptors in leukemic cell lines. *Leukemia* **11**, 1453–1458 (1997).
128. Katagiri, Y., Hirata, Y., Milbrandt, J. & Guroff, G. Differential regulation of the transcriptional activity of the orphan nuclear receptor NGFI-B by membrane depolarization and nerve growth factor. *J Biol Chem* **272**, 31278–31284 (1997).
129. Arkenbout, E. K. *et al.* Protective function of transcription factor TR3 orphan receptor in atherogenesis: Decreased lesion formation in carotid artery ligation model in TR3 transgenic mice. *Circulation* **106**, 1530–1535 (2002).
130. Zhao, Y. & Brummer, D. NR4A orphan nuclear receptors: Transcriptional regulators of gene expression in metabolism and vascular biology. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30**,

- 1535–1541 (2010).
131. Pols, T. W. H., Bonta, P. I. & de Vries, C. J. M. NR4A nuclear orphan receptors: protective in vascular disease? *Curr. Opin. Lipidol.* **18**, 515–520 (2007).
  132. Ipseiz, N. *et al.* The nuclear receptor Nr4a1 mediates anti-inflammatory effects of apoptotic cells. *J. Immunol.* **192**, 4852–8 (2014).
  133. Bonta, P. I. *et al.* Nuclear receptors Nur77, Nurr1, and NOR-1 expressed in atherosclerotic lesion macrophages reduce lipid loading and inflammatory responses. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26**, 2288–2294 (2006).
  134. Delgado, E. *et al.* High expression of orphan nuclear receptor NR4A1 in a subset of ovarian tumors with worse outcome. *Gynecol. Oncol.* (2016). doi:10.1016/j.ygyno.2016.02.030
  135. Wenzl, K., Troppan, K., Neumeister, P. & Deutsch, A. J. A. The nuclear orphan receptor NR4A1 and NR4A3 as tumor suppressors in hematologic neoplasms. *Curr. Drug Targets* **16**, 38–46 (2015).
  136. Wang, J., Yang, J., Zou, Y., Huang, G.-L. & He, Z.-W. Orphan nuclear receptor nurr1 as a potential novel marker for progression in human prostate cancer. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **14**, 2023–8 (2013).
  137. De Paoli, F. *et al.* The neuron-derived orphan receptor 1 (NOR1) is induced upon human alternative macrophage polarization and stimulates the expression of markers of the M2 phenotype. *Atherosclerosis* **241**, 18–26 (2015).
  138. Qing, H. *et al.* Deficiency of the NR4A orphan nuclear receptor NOR1 in hematopoietic stem cells accelerates atherosclerosis. *Stem Cells* **32**, 2419–29 (2014).
  139. Decressac, M., Volakakis, N., Björklund, A. & Perlmann, T. NURR1 in Parkinson disease--from pathogenesis to therapeutic potential. *Nat. Rev. Neurol.* **9**, 629–36 (2013).
  140. Lappas, M. The NR4A receptors Nurr1 and Nur77 are increased in human placenta from women with gestational diabetes. *Placenta* **35**, 866–75 (2014).
  141. Fu, Y., Luo, L., Luo, N., Zhu, X. & Garvey, W. T. NR4A orphan nuclear receptors modulate insulin action and the glucose transport system: potential role in insulin resistance. *J. Biol. Chem.* **282**, 31525–33 (2007).
  142. Ranhotra, H. S. The NR4A orphan nuclear receptors: mediators in metabolism and diseases. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* **35**, 184–8 (2015).
  143. Wilson, T. E., Fahrner, T. J., Johnston, M. & Milbrandt, J. Identification of the DNA binding site for NGFI-B by genetic selection in yeast. *Science* **252**, 1296–1300 (1991).
  144. Philips, a *et al.* Novel dimeric Nur77 signaling mechanism in endocrine and lymphoid cells. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 5946–5951 (1997).
  145. Maira, M., Martens, C., Philips, A. & Drouin, J. Heterodimerization between members of the Nur subfamily of orphan nuclear receptors as a novel mechanism for gene activation. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 7549–57 (1999).
  146. Zetterström, R. H., Solomin, L., Mitsiadis, T., Olson, L. & Perlmann, T. Retinoid X receptor heterodimerization and developmental expression distinguish the orphan nuclear

- receptors NGFI-B, Nurr1, and Nor1. *Mol. Endocrinol.* **10**, 1656–66 (1996).
147. Ohkura, N. *et al.* Structure, mapping and expression of a human NOR-1 gene, the third member of the Nur77/NGFI-B family. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.* **1308**, 205–214 (1996).
148. Ohkura, N. *et al.* Alternative splicing generates isoforms of human neuron-derived orphan receptor-1 (NOR-1) mRNA. *Gene* **211**, 79–85 (1998).
149. Labelle, Y., Bussi eres, J., Courjal, F. & Goldring, M. B. The EWS/TEC fusion protein encoded by the t(9;22) chromosomal translocation in human chondrosarcomas is a highly potent transcriptional activator. *Oncogene* **18**, 3303–8 (1999).
150. Ohkura, N., Hosono, T., Maruyama, K., Tsukada, T. & Yamaguchi, K. An isoform of Nurr1 functions as a negative inhibitor of the NGFI-B family signaling. *Biochim. Biophys. Acta* **1444**, 69–79 (1999).
151. Wansa, K. D. S. A., Harris, J. M., Yan, G., Ordentlich, P. & Muscat, G. E. O. The AF-1 domain of the orphan nuclear receptor NOR-1 mediates trans-activation, coactivator recruitment, and activation by the purine anti-metabolite 6-mercaptopurine. *J. Biol. Chem.* **278**, 24776–90 (2003).
152. Wansa, K. D. S. A., Harris, J. M. & Muscat, G. E. O. The activation function-1 domain of Nur77/NR4A1 mediates trans-activation, cell specificity, and coactivator recruitment. *J. Biol. Chem.* **277**, 33001–11 (2002).
153. Baker, K. D. *et al.* The Drosophila orphan nuclear receptor DHR38 mediates an atypical ecdysteroid signaling pathway. *Cell* **113**, 731–742 (2003).
154. Wang, Z. *et al.* Structure and function of Nurr1 identifies a class of ligand-independent nuclear receptors. *Nature* **423**, 555–560 (2003).
155. Zhan, Y. *et al.* Cytosporone B is an agonist for nuclear orphan receptor Nur77. *Nat. Chem. Biol.* **4**, 548–556 (2008).
156. Vinayavekhin, N. & Saghatelian, A. Discovery of a protein-metabolite interaction between unsaturated fatty acids and the nuclear receptor Nur77 Using a metabolomics approach. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 17168–17171 (2011).
157. Codina, A. *et al.* Identification of a novel co-regulator interaction surface on the ligand binding domain of Nurr1 using NMR footprinting. *J. Biol. Chem.* **279**, 53338–53345 (2004).
158. de Vries, C. J., van Achterberg, T. a, Horrevoets, a J., ten Cate, J. W. & Pannekoek, H. Differential display identification of 40 genes with altered expression in activated human smooth muscle cells. Local expression in atherosclerotic lesions of smags, smooth muscle activation-specific genes. *J. Biol. Chem.* **275**, 23939–47 (2000).
159. Rius, J., Martínez-González, J., Crespo, J. & Badimon, L. Involvement of neuron-derived orphan receptor-1 (NOR-1) in LDL-induced mitogenic stimulus in vascular smooth muscle cells: role of CREB. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 697–702 (2004).
160. Martínez-González, J., Rius, J., Castelló, A., Cases-Langhoff, C. & Badimon, L. Neuron-derived orphan receptor-1 (NOR-1) modulates vascular smooth muscle cell proliferation. *Circ. Res.* **92**, 96–103 (2003).

161. Martorell, L., Martínez-González, J., Crespo, J., Calvayrac, O. & Badimon, L. Neuron-derived orphan receptor-1 (NOR-1) is induced by thrombin and mediates vascular endothelial cell growth. *J. Thromb. Haemost.* **5**, 1766–73 (2007).
162. Rius, J., Martínez-González, J., Crespo, J. & Badimon, L. NOR-1 is involved in VEGF-induced endothelial cell growth. *Atherosclerosis* **184**, 276–82 (2006).
163. Nomiya, T. *et al.* The NR4A orphan nuclear receptor NOR1 is induced by platelet-derived growth factor and mediates vascular smooth muscle cell proliferation. *J. Biol. Chem.* **281**, 33467–76 (2006).
164. Thakar, R. G. *et al.* Cell-shape regulation of smooth muscle cell proliferation. *Biophys. J.* **96**, 3423–3432 (2009).
165. Li, P. *et al.* MicroRNA-638 is highly expressed in human vascular smooth muscle cells and inhibits PDGF-BB-induced cell proliferation and migration through targeting orphan nuclear receptor NOR1. *Cardiovasc. Res.* **99**, 185–193 (2013).
166. Gizard, F. *et al.* Transcriptional regulation of S phase kinase-associated protein 2 by NR4A orphan nuclear receptor NOR1 in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **286**, 35485–35493 (2011).
167. Rodríguez-Calvo, R., Guadall, A., Calvayrac, O., Navarro, M.A., Alonso, J., Ferrán, B., de Diego, A., Muniesa, P., Osada, J., Rodríguez, C., Martínez-González, J. Over-expression of neuron-derived orphan receptor-1 (NOR-1) exacerbates neointimal hyperplasia after vascular injury. *Hum. Mol. Genet.* **22**, 1949–59 (2013).
168. Nomiya, T. *et al.* Deficiency of the NR4A neuron-derived orphan receptor-1 attenuates neointima formation after vascular injury. *Circulation* **119**, 577–586 (2009).
169. Wang, L., Gong, F., Dong, X., Zhou, W. & Zeng, Q. Regulation of vascular smooth muscle cell proliferation by nuclear orphan receptor Nur77. *Mol. Cell. Biochem.* **341**, 159–166 (2010).
170. Zeng, H. *et al.* Orphan nuclear receptor TR3/Nur77 regulates VEGF-A-induced angiogenesis through its transcriptional activity. *J. Exp. Med.* **203**, 719–29 (2006).
171. Wang, L., Dong, X., Zhou, W., Zeng, Q. & Mao, Y. PDGF-induced proliferation of smooth muscular cells is related to the regulation of CREB phosphorylation and Nur77 expression. *J. Huazhong Univ. Sci. Technol. - Med. Sci.* **31**, 169–173 (2011).
172. Liu, Y. *et al.* Nur77 suppresses pulmonary artery smooth muscle cell proliferation through inhibition of the STAT3/Pim-1/NFAT pathway. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **50**, 379–388 (2014).
173. Arkenbout, E. K. *et al.* TR3 orphan receptor is expressed in vascular endothelial cells and mediates cell cycle arrest. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **23**, 1535–1540 (2003).
174. Bonta, P. I. *et al.* Nuclear receptor nurr1 is expressed in and is associated with human restenosis and inhibits vascular lesion formation in mice involving inhibition of smooth muscle cell proliferation and inflammation. *Circulation* **121**, 2023–2032 (2010).
175. Pires, N. M. M. *et al.* Activation of nuclear receptor Nur77 by 6-mercaptopurine protects against neointima formation. *Circulation* **115**, 493–500 (2007).
176. Liu, W.-S. *et al.* Inhibitory effect of n-butylidenephthalide on neointimal hyperplasia in

- balloon injured rat carotid artery. *Phytother. Res.* **25**, 1494–502 (2011).
177. Huo, Y. *et al.* Induction of Nur77 by hyperoside inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal formation. *Biochem. Pharmacol.* **92**, 590–598 (2014).
178. de Waard, V. *et al.* TR3 nuclear orphan receptor prevents cyclic stretch-induced proliferation of venous smooth muscle cells. *Am. J. Pathol.* **168**, 2027–35 (2006).
179. Crespo, J., Martínez-González, J., Rius, J. & Badimon, L. Simvastatin inhibits NOR-1 expression induced by hyperlipemia by interfering with CREB activation. *Cardiovasc. Res.* **67**, 333–341 (2005).
180. Liu, J. *et al.* Reduced macrophage apoptosis is associated with accelerated atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-null mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**, 174–179 (2005).
181. Tabas, I. Consequences and therapeutic implications of macrophage apoptosis in atherosclerosis: The importance of lesion stage and phagocytic efficiency. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **25**, 2255–2264 (2005).
182. Tabas, I. Macrophage apoptosis in atherosclerosis: consequences on plaque progression and the role of endoplasmic reticulum stress. *Antioxid. Redox Signal.* **11**, 2333–9 (2009).
183. Martorell, L., Gentile, M., Rius, J., Rodríguez, C., Crespo, J., Badimon, L., Martínez-González, J. The hypoxia-inducible factor 1/NOR-1 axis regulates the survival response of endothelial cells to hypoxia. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 5828–5842 (2009).
184. Martínez-González, J., Llorente-Cortés, V. & Badimon, L. Biología celular y molecular de las lesiones ateroscleróticas. *Rev. Esp. Cardiol.* **54**, 218–231 (2001).
185. Barish, G. D. *et al.* A Nuclear Receptor Atlas: macrophage activation. *Mol. Endocrinol.* **19**, 2466–2477 (2005).
186. Shao, Q. *et al.* Nuclear receptor Nur77 suppresses inflammatory response dependent on COX-2 in macrophages induced by oxLDL. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **49**, 304–311 (2010).
187. Hanna, R. N. *et al.* NR4A1 (Nur77) deletion polarizes macrophages toward an inflammatory phenotype and increases atherosclerosis. *Circ. Res.* **110**, 416–427 (2012).
188. Hamers, A. A. J. *et al.* Bone marrow-specific deficiency of nuclear receptor Nur77 enhances atherosclerosis. *Circ. Res.* **110**, 428–438 (2012).
189. Zhao, Y. *et al.* Deficiency of the NR4A orphan nuclear receptor NOR1 decreases monocyte adhesion and atherosclerosis. *Circ. Res.* **107**, 501–511 (2010).
190. Sambri, I., Crespo, J., Aguiló, S., Ingrosso, D., Rodríguez, C., Martínez-González, J. miR-17 and -20a Target the Neuron-Derived Orphan Receptor-1 (NOR-1) in Vascular Endothelial Cells. *PLoS One* **10**, e0141932 (2015).
191. Gruber, F. *et al.* Direct binding of Nur77/NAK-1 to the plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) promoter regulates TNF $\alpha$ -induced PAI-1 expression. *Blood* **101**, 3042–3048 (2003).
192. You, B., Jiang, Y.-Y., Chen, S., Yan, G. & Sun, J. The orphan nuclear receptor Nur77 suppresses endothelial cell activation through induction of IkappaB $\alpha$  expression. *Circ. Res.* **104**, 742–9 (2009).

193. Pearen, M. A. *et al.* The orphan nuclear receptor, NOR-1, is a target of beta-adrenergic signaling in skeletal muscle. *Endocrinology* **147**, 5217–27 (2006).
194. Lim, R. W., Zhu, C. Y. & Stringer, B. Differential regulation of primary response gene expression in skeletal muscle cells through multiple signal transduction pathways. *Biochim Biophys Acta* **1266**, 91–100 (1995).
195. Mahoney, D. J., Parise, G., Melov, S., Safdar, A. & Tarnopolsky, M. A. Analysis of global mRNA expression in human skeletal muscle during recovery from endurance exercise. *FASEB J.* **19**, 1498–500 (2005).
196. Pearen, M. a *et al.* The nuclear receptor, Nor-1, markedly increases type II oxidative muscle fibers and resistance to fatigue. *Mol. Endocrinol.* **26**, 372–84 (2012).
197. Liu, Q., Zhu, X., Xu, L., Fu, Y. & Garvey, W. T. 6-Mercaptopurine augments glucose transport activity in skeletal muscle cells in part via a mechanism dependent upon orphan nuclear receptor NR4A3. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **305**, E1081–92 (2013).
198. Pearen, M. A. *et al.* The Orphan Nuclear Receptor, NOR-1, a Target of beta-Adrenergic Signaling, Regulates Gene Expression that Controls Oxidative Metabolism in Skeletal Muscle. *Endocrinology* **149**, 2853–2865 (2008).
199. Pearen, M. a *et al.* Transgenic muscle-specific nor-1 expression regulates multiple pathways that effect adiposity, metabolism, and endurance. *Mol. Endocrinol.* **27**, 1897–917 (2013).
200. Rehman, A. a., Ahsan, H. & Khan, F. H. Alpha-2-macroglobulin: A physiological guardian. *J. Cell. Physiol.* **228**, 1665–1675 (2013).
201. Borth, W. Alpha 2-macroglobulin, a multifunctional binding protein with targeting characteristics. *FASEB J.* **6**, 3345–53 (1992).
202. Barrett, A. J. & Starkey, P. M. The interaction of alpha 2-macroglobulin with proteinases. Characteristics and specificity of the reaction, and a hypothesis concerning its molecular mechanism. *Biochem. J.* **133**, 709–24 (1973).
203. Sottrup-Jensen, L. Alpha-macroglobulins: structure, shape, and mechanism of proteinase complex formation. *J. Biol. Chem.* **264**, 11539–42 (1989).
204. Boel, E. *et al.* Expression of human alpha 2-macroglobulin cDNA in baby hamster kidney fibroblasts: secretion of high levels of active alpha 2-macroglobulin. *Biochemistry* **29**, 4081–4087 (1990).
205. He, H. *et al.* Characterization of a murine alpha 2 macroglobulin gene expressed in reproductive and cardiovascular tissue. *Biol. Reprod.* **72**, 266–275 (2005).
206. Wyatt, A. R., Zammit, N. W. & Wilson, M. R. Acute phase proteins are major clients for the chaperone action of  $\alpha_2$ -macroglobulin in human plasma. *Cell stress & chaperones* **18**, 161–70 (2013).
207. Meyer, C., Hinrichs, W. & Hahn, U. Human  $\alpha(2)$ -Macroglobulin-Another Variation on the Venus Flytrap. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2–5 (2012). doi:10.1002/anie.201201104
208. Lin, Z., Lo, A., Simeone, D. M., Ruffin, M. T. & Lubman, D. M. An N-glycosylation Analysis of Human Alpha-2-Macroglobulin Using an Integrated Approach. *J. Proteomics Bioinform.* **5**, 127–134 (2012).

209. Blacker, D. *et al.* Alpha-2 macroglobulin is genetically associated with Alzheimer disease. *Nat. Genet.* **19**, 357–360 (1998).
210. Kovacs, D. M. alpha2-macroglobulin in late-onset Alzheimer's disease. *Exp. Gerontol.* **35**, 473–479 (2000).
211. Liao, A. *et al.* Genetic association of an alpha2-macroglobulin (Val1000Ile) polymorphism and Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* **7**, 1953–1956 (1998).
212. Smith, E. B. Molecular interactions in human atherosclerotic plaques. *Am J Pathol* **86**, 665–674 (1977).
213. Smith, E. B. & Ashall, C. Compartmentalization of water in human atherosclerotic lesions. Changes in distribution and exclusion volumes for plasma macromolecules. *Arteriosclerosis* **4**, 21–27 (1984).
214. Grabowska-Bochenek, R., Drozd, M., Kopiczna-Grzebieniak, E. & Piekarski, M. Concentration of some proteinase inhibitors: alpha 1-antitrypsin and alpha 2-macroglobulin in rabbit blood serum in two models of experimental atherosclerosis. *Acta Biochim Pol* **37**, 125–127 (1990).
215. Hollander, W., Colombo, M. A., Kirkpatrick, B. & Paddock, J. Soluble proteins in the human atherosclerotic plaque. With spectral reference to immunoglobulins, C3-complement component, alpha 1-antitrypsin and alpha 2-macroglobulin. *Atherosclerosis* **34**, 391–405 (1979).
216. Werb, Z., Burleigh, M. C., Barrett, A. J. & Starkey, P. M. The interaction of alpha2-macroglobulin with proteinases. Binding and inhibition of mammalian collagenases and other metal proteinases. *Biochem. J.* **139**, 359–68 (1974).
217. Downing, M. R., Bloom, J. W. & Mann, K. G. Comparison of the inhibition of thrombin by three plasma protease inhibitors. *Biochemistry* **17**, 2649–2653 (1978).
218. Ellis, V., Scully, M., Macgregor, I. & Kakkar, V. Inhibition of human factor Xa by various plasma protease inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* **701**, 26–31 (1982).
219. Harpel, P. C. Plasmin inhibitor interactions. The effectiveness of alpha2-plasmin inhibitor in the presence of alpha2-macroglobulin. *J. Exp. Med.* **146**, 1033–40 (1977).
220. Holmberg, L., Lecander, I. & Astedt, B. Binding of urokinase to plasma proteinase inhibitors. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **40**, 743–7 (1980).
221. Korninger, C. & Collen, D. Neutralization of human extrinsic (tissue-type) plasminogen activator in human plasma: no evidence for a specific inhibitor. *Thromb. Haemost.* **46**, 662–5 (1981).
222. Salvesen, G. S. & Barrett, A. J. Covalent binding of proteinases in their reaction with alpha 2-macroglobulin. *Biochem. J.* **187**, 695–701 (1980).
223. Ikari, Y., Mulvihill, E. & Schwartz, S. M. alpha 1-Proteinase inhibitor, alpha 1-antichymotrypsin, and alpha 2-macroglobulin are the antiapoptotic factors of vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 11798–803 (2001).
224. Heinrich, P. C. *et al.* Interleukin-6 and related cytokines: effect on the acute phase reaction. *Z. Ernährungswiss.* **37 Suppl 1**, 43–49 (1998).

225. Lerner, L., Henriksen, M. A., Zhang, X. & Darnell, J. E. STAT3-dependent enhanceosome assembly and disassembly: synergy with GR for full transcriptional increase of the alpha 2-macroglobulin gene. *Genes Dev.* **17**, 2564–77 (2003).
226. Dajee, M., Fey, G. H. & Richards, J. S. Stat 5b and the orphan nuclear receptors regulate expression of the alpha2-macroglobulin (alpha2M) gene in rat ovarian granulosa cells. *Mol. Endocrinol.* **12**, 1393–409 (1998).
227. Crookston, K. P., Webb, D. J., Wolf, B. B. & Gonias, S. L. Classification of alpha 2-macroglobulin-cytokine interactions based on affinity of noncovalent association in solution under apparent equilibrium conditions. *J. Biol. Chem.* **269**, 1533–40 (1994).
228. Gourine, A. V *et al.* Role of alpha(2)-macroglobulin in fever and cytokine responses induced by lipopolysaccharide in mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **283**, R218–26 (2002).
229. Peslova, G. *et al.* Hecpidin, the hormone of iron metabolism, is bound specifically to ??-2-macroglobulin in blood. *Blood* **113**, 6225–6236 (2009).
230. Birkenmeier, G., Kämpfer, I., Kratzsch, J. & Schellenberger, W. Human leptin forms complexes with  $\alpha$ 2-macroglobulin which are recognized by the  $\alpha$ 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein. *Eur. J. Endocrinol.* **139**, 224–230 (1998).
231. Liu, C. J. *et al.* ADAMTS-12 associates with and degrades cartilage oligomeric matrix protein. *J. Biol. Chem.* **281**, 15800–15808 (2006).
232. Liu, C. J. *et al.* ADAMTS-7: a metalloproteinase that directly binds to and degrades cartilage oligomeric matrix protein. *FASEB J.* **20**, 988–990 (2006).
233. Patzak, D., Zhuchenko, O., Lee, C. C. & Wehnert, M. Identification, mapping, and genomic structure of a novel X-chromosomal human gene (SMPX) encoding a small muscular protein. *Hum. Genet.* **105**, 506–12 (1999).
234. Palmer, S. *et al.* The small muscle-specific protein CSI modifies cell shape and promotes myocyte fusion in an insulin-like growth factor 1-dependent manner. *J. Cell Biol.* **153**, 985–997 (2001).
235. Schindeler, A., Lavulo, L. & Harvey, R. P. Muscle costameric protein, Chisel/Smpx, associates with focal adhesion complexes and modulates cell spreading in vitro via a Rac1/p38 pathway. *Exp. Cell Res.* **307**, 367–380 (2005).
236. Hatcher, C. J. & Basson, C. T. Specification of the cardiac conduction system by transcription factors. *Circ. Res.* **105**, 620–30 (2009).
237. Christoffels, V. M. *et al.* T-box transcription factor Tbx2 represses differentiation and formation of the cardiac chambers. *Dev. Dyn.* **229**, 763–70 (2004).
238. Hoogaars, W. M. H. *et al.* Tbx3 controls the sinoatrial node gene program and imposes pacemaker function on the atria. *Genes Dev.* **21**, 1098–112 (2007).
239. Kemp, T. J. *et al.* Identification of a novel stretch-responsive skeletal muscle gene (Smpx). *Genomics* **72**, 260–271 (2001).
240. Ren, Z.-Q., Xiong, Y.-Z., Deng, C.-Y. & Lei, M.-G. Cloning and identification of porcine SMPX differentially expressed in F1 crossbreds and their parents. *Acta Biochim. Biophys.*

- Sin. (Shanghai)*. **38**, 753–8 (2006).
241. Cabane, C., Englaro, W., Yeow, K., Ragno, M. & Dérijard, B. Regulation of C2C12 myogenic terminal differentiation by MKK3/p38alpha pathway. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **284**, C658–C666 (2003).
242. Schober, A. & Zerneck, A. Chemokines in vascular remodeling. *Thromb. Haemost.* **97**, 730–7 (2007).
243. Renna, N. F., de Las Heras, N. & Miatello, R. M. Pathophysiology of vascular remodeling in hypertension. *Int. J. Hypertens.* **2013**, 808353 (2013).
244. Wang, S. *et al.* Activation of AMP-activated protein kinase  $\alpha 2$  by nicotine instigates formation of abdominal aortic aneurysms in mice in vivo. *Nat. Med.* **18**, 902–910 (2012).
245. Andrés, V. Control of vascular cell proliferation and migration by cyclin-dependent kinase signalling: new perspectives and therapeutic potential. *Cardiovasc Res* **63**, 11–21 (2004).
246. Stouffer, G. A., LaMarre, J., Gonias, S. L. & Owens, G. K. Activated alpha 2-macroglobulin and transforming growth factor-beta 1 induce a synergistic smooth muscle cell proliferative response. *J. Biol. Chem.* **268**, 18340–18344 (1993).
247. Ikari, Y., Fujikawa, K., Yee, K. O. & Schwartz, S. M. Alpha(1)-proteinase inhibitor, alpha(1)-antichymotrypsin, or alpha(2)-macroglobulin is required for vascular smooth muscle cell spreading in three-dimensional fibrin gel. *J Biol Chem* **275**, 12799–12805 (2000).
248. Martínez-González, J., Vinals, M., Vidal, F., Llorente-Cortes, V. & Badimon, L. Mevalonate deprivation impairs IGF-I/insulin signaling in human vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* **135**, 213–223 (1997).
249. Chomczynski, P. & Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156–159 (1987).
250. González-Díez, M., Rodríguez, C., Badimon, L. & Martínez-González, J. Prostacyclin induction by high-density lipoprotein (HDL) in vascular smooth muscle cells depends on sphingosine 1-phosphate receptors: Effect of simvastatin. *Thromb. Haemost.* **100**, 119–126 (2008).
251. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, L. & Randall, R. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275 (1951).
252. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).
253. Hanahan & D. in *In: Glover D M, editor. DNA cloning: a practical approach. Vol. 1. Oxford, United Kingdom: IRL Press* 109–135 (1985).
254. Sottrup-Jensen, L., Sand, O., Kristensen, L. & Fey, G. H. The ??-macroglobulin bait region. Sequence diversity and localization of cleavage sites for proteinases in five mammalian ??-macroglobulins. *J. Biol. Chem.* **264**, 15781–15789 (1989).
255. Pei, L. *et al.* NR4A orphan nuclear receptors are transcriptional regulators of hepatic glucose metabolism. *Nat. Med.* **12**, 1048–1055 (2006).
256. Mohan, H. M. *et al.* Molecular pathways: The role of NR4A orphan nuclear receptors in cancer. *Clin. Cancer Res.* **18**, 3223–3228 (2012).

257. Price, M. G. Skelemins: Cytoskeletal proteins located at the periphery of M-discs in mammalian striated muscle. *J. Cell Biol.* **104**, 1325–1336 (1987).
258. Price, M. G. & Gomer, R. H. Skelemin, a cytoskeletal M-disc periphery protein, contains motifs of adhesion/recognition and intermediate filament proteins. *J. Biol. Chem.* **268**, 21800–10 (1993).
259. Steiner, F., Weber, K. & Fürst, D. O. M band proteins myomesin and skelemin are encoded by the same gene: analysis of its organization and expression. *Genomics* **56**, 78–89 (1999).
260. Pinotsis, N. *et al.* Superhelical architecture of the myosin filament-linking protein myomesin with unusual elastic properties. *PLoS Biol.* **10**, (2012).
261. Tskhovrebova, L. & Trinick, J. Making muscle elastic: The structural basis of myomesin stretching. *PLoS Biol.* **10**, (2012).
262. Reddy, K. B., Gascard, P., Price, M. G., Negrescu, E. V. & Fox, J. E. B. Identification of an interaction between the M-band protein skelemin and beta-integrin subunits: Colocalization of a skelemin-like protein with beta1- and beta3-integrins in non-muscle cells. *J. Biol. Chem.* **273**, 35039–35047 (1998).
263. Reddy, K. B., Bialkowska, K. & Fox, J. E. B. Dynamic modulation of cytoskeletal proteins linking integrins to signaling complexes in spreading cells: Role of skelemin in initial integrin-induced spreading. *J. Biol. Chem.* **276**, 28300–28308 (2001).
264. Deshmukh, L. *et al.* Structural insight into the interaction between platelet integrin $\alpha$ IIb $\beta$ 3 and cytoskeletal protein skelemin. *J. Biol. Chem.* **282**, 32349–32356 (2007).
265. Li, X., Liu, Y. & Haas, T. A. Skelemin in integrin  $\alpha$ (IIb) $\beta$ (3) mediated cell spreading. *Biochemistry* **52**, 681–689 (2013).
266. Reddy, K. B. *et al.* Nuclear localization of myomesin-1: Possible functions. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **29**, 1–8 (2008).
267. Agarkova, I., Auerbach, D., Ehler, E. & Perriard, J. C. A novel marker for vertebrate embryonic heart, the EH-myomesin isoform. *J. Biol. Chem.* **275**, 10256–64 (2000).
268. Schoenauer, R. *et al.* EH-myomesin splice isoform is a novel marker for dilated cardiomyopathy. *Basic Res. Cardiol.* **106**, 233–47 (2011).
269. Chen, Q. *et al.* Matrix metalloproteinases: inflammatory regulators of cell behaviors in vascular formation and remodeling. *Mediators Inflamm.* **2013**, 928315 (2013).
270. Nagase, H., Visse, R. & Murphy, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc. Res.* **69**, 562–573 (2006).
271. Bonta, P. I. *et al.* Nuclear receptor Nur77 inhibits vascular outward remodelling and reduces macrophage accumulation and matrix metalloproteinase levels. *Cardiovasc. Res.* **87**, 561–8 (2010).
272. Mix, K. S. *et al.* Transcriptional repression of matrix metalloproteinase gene expression by the orphan nuclear receptor NURR1 in cartilage. *J. Biol. Chem.* **282**, 9492–9504 (2007).
273. Mix, K. S. *et al.* Orphan nuclear receptor NR4A2 induces synovioyte proliferation, invasion, and matrix metalloproteinase 13 transcription. *Arthritis Rheum.* **64**, 2126–2136

- (2012).
274. Zhang, X., Yan, G., Diao, Z., Sun, H. & Hu, Y. NUR77 inhibits the expression of TIMP2 and increases the migration and invasion of HTR-8/SVneo cells induced by CYR61. *Placenta* **33**, 561–567 (2012).
  275. Lerner, L., Henriksen, M. A., Zhang, X. & Darnell, J. E. STAT3-dependent enhanceosome assembly and disassembly: Synergy with GR for full transcriptional increase of the alpha2-macroglobulin gene. *Genes Dev.* **17**, 2564–2577 (2003).
  276. Zhao, Y., Liu, Y. & Zheng, D. Alpha 1-antichymotrypsin/SerpinA3 is a novel target of orphan nuclear receptor Nur77. *FEBS J.* **275**, 1025–1038 (2008).
  277. Adya, R., Tan, B. K., Chen, J. & Randevara, H. S. Nuclear factor-kappaB induction by visfatin in human vascular endothelial cells: its role in MMP-2/9 production and activation. *Diabetes Care* **31**, 758–760 (2008).
  278. Myers, S., Eriksson, N., Burow, R., Wang, S.-C. M. & Muscat, G. E. O. Beta-adrenergic signaling regulates NR4A nuclear receptor and metabolic gene expression in multiple tissues. *Mol. Cell. Endocrinol.* **309**, 101–8 (2009).
  279. Kawasaki, E. *et al.* Role of local muscle contractile activity in the exercise-induced increase in NR4A receptor mRNA expression. *J. Appl. Physiol.* **106**, 1826–1831 (2009).
  280. Petrie, M. A., Suneja, M., Faidley, E. & Shields, R. K. A minimal dose of electrically induced muscle activity regulates distinct gene signaling pathways in humans with spinal cord injury. *PLoS One* **9**, (2014).
  281. Feng, X.-J. *et al.* The orphan receptor NOR1 participates in isoprenaline-induced cardiac hypertrophy by regulating PARP-1. *Br. J. Pharmacol.* **172**, 2852–63 (2015).
  282. McPherron, a C., Lawler, a M. & Lee, S. J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature* **387**, 83–90 (1997).
  283. Tontonoz, P. *et al.* The orphan nuclear receptor Nur77 is a determinant of myofiber size and muscle mass in mice. *Mol. Cell. Biol.* **35**, MCB.00715–14 (2015).
  284. Glass, C. K. & Ogawa, S. Combinatorial roles of nuclear receptors in inflammation and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 44–55 (2006).

***ANEXOS***



## 1. ANEXO I

Publicación *NR4A receptors up-regulate the antiproteinase alpha-2 macroglobulin (A2M) and modulate MMP-2 and MMP-9 in vascular smooth muscle cells.*



## NR4A receptors up-regulate the antiproteinase alpha-2 macroglobulin (A2M) and modulate MMP-2 and MMP-9 in vascular smooth muscle cells

Ricardo Rodríguez-Calvo<sup>†</sup>; Beatriz Ferrán<sup>†</sup>; Judith Alonso; Ingrid Martí-Pàmies; Sílvia Aguiló; Olivier Calvayrac; Cristina Rodríguez; José Martínez-González

Centro de Investigación Cardiovascular, CSIC-ICCC, IIB-Sant Pau, Barcelona, Spain

### Summary

Matrix metalloproteinases (MMPs) are associated with tissue remodelling and repair. In non-vascular tissues, NR4A receptors have been involved in the regulation of MMPs by transcriptional repression mechanisms. Here, we analyse alternative mechanisms involving NR4A receptors in the modulation of MMP activity in vascular smooth muscle cells (VSMC). Lentiviral overexpression of NR4A receptors (NOR-1, Nurr1 and Nur77) in human VSMC strongly decreased MMP-2 and MMP-9 activities (analysed by zymography and DQ-gelatin assays) and protein levels. NR4A receptors also down-regulated MMP-2 mRNA levels. Real-time PCR analysis evidenced that alpha-2-macroglobulin (A2M), but not other MMP inhibitors (TIMP-1 and TIMP-2) were up-regulated in NR4A-transduced cells. Interestingly, A2M was expressed in human vascular tissues including the smooth muscle media layer. While NR4A receptors increased A2M expression and secretion in VSMC, NR4A knockdown significantly reduced basal A2M expression in these cells. The direct transcriptional regulation of the

human A2M promoter by NR4A receptors was characterised in luciferase reporter assays, electrophoretic mobility shift assays and by chromatin immunoprecipitation, identifying a NGFI-B response element (NBRE-71/-64) essential for the NR4A-mediated induction. The blockade of A2M partially prevented the reduction of MMPs activity observed in NR4A-transduced cells. Although mouse A2M promoter was unresponsive to NR4A receptors, vascular MMP expression was attenuated in transgenic mice over-expressing human NOR-1 in VSMC challenged with lipopolysaccharide. Our results show that the pan-proteinase inhibitor A2M is expressed in the vasculature and that NR4A receptors modulate VSMC MMP activity by several mechanisms including the up-regulation of A2M.

### Keywords

Matrix metalloproteinases, vascular remodelling, gene expression, transcription factors, smooth muscle cells

### Correspondence to:

José Martínez-González  
Centro de Investigación Cardiovascular (CSIC-ICCC)  
Hospital de la Santa Creu i Sant Pau  
Avda. Sant Antoni Maria Claret 167  
08025 Barcelona, Spain  
Tel.: +34 935565896, Fax: +34 935565559  
E-mail: jmartinez@csic-iccc.org

### Financial support:

This work was supported by the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO)-Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) [grants PI12/01952, SAF2012-40127, RD12/0042/0053], BF and JA were supported by funds provided by Consejo Superior de Investigaciones Científicas and MINECO (JAE pre and FI programs, respectively).

Received: July 31, 2014

Accepted after major revision: January 20, 2015

Epub ahead of print: March 26, 2015

<http://dx.doi.org/10.1160/TH14-07-0645>

Thromb Haemost 2015; 113: 1323–1334

<sup>†</sup> Both authors contributed equally to this work.

## Introduction

Vascular remodelling enables the healing and adaptation of blood vessels to mechanical injury or haemodynamic changes, and underlies pathogenic processes such as atherosclerosis, restenosis and abdominal aortic aneurysm (1, 2). Physiological and pathological vascular remodelling encompasses an orchestrated degradation and reorganisation of vascular extracellular matrix (ECM) by matrix metalloproteinases (MMPs) (3).

In atherothrombosis, MMPs are thought to be involved in those mechanisms responsible for the growth, unstabilisation, and eventual rupture of atherosclerotic lesions (4). To avoid an excessive proteolysis of ECM, MMP activity is precisely controlled at the level of transcription and activation of the precursor zymogens,

but also by enzymatic inhibition (5). Tissue inhibitors of MMPs (TIMPs) are specific inhibitors of MMPs that control their local activities. MMP activity is also sensitive to other inhibitors present in plasma/extracellular space such as alpha-2-macroglobulin (A2M, alpha 2M or  $\alpha$ 2M) (6), an antiprotease with a broad-spectrum specificity that also inhibits essential components of the coagulation and fibrinolytic systems (7, 8). A2M is synthesised mainly in the liver, but also locally by monocytes/macrophages, fibroblasts, and adrenocortical cells (9–11). A2M seems to play a relevant role in vascular biology by regulating VSMC spreading, proliferation and survival (12–14).

We and others have recently involved NR4A receptors in vascular remodelling (15–19). The NR4A subfamily of nuclear receptors consists of three closely related members: Nur77 (NR4A1), Nurr1

(NR4A2) and NOR-1 (NR4A3) (20). These receptors seem to be constitutively active, ligand-independent transcription factors (21), that act as early-response genes up-regulated by a variety of stimuli including growth factors and molecules with mitogen-like activity such as lipoproteins or thrombin (15, 22–26). NR4A receptors have been shown to regulate VSMC spreading, proliferation and the apoptosis/survival balance (15, 27–29). Currently, however, we have a limited knowledge about NR4A target genes and few information concerning the potential ability of these receptors to modulate ECM remodelling in vascular cells is available. Interestingly, in endothelial cells Nur77 up-regulates the expression of PAI-1 (30), a proteinase inhibitor involved in vascular remodelling, and it has been shown that Nurr1 down-regulates the expression of MMP-1 in chondrocytes by a transcriptional repression mechanism (31). In the present study we show that NR4A receptors inhibit VSMC MMP activity at least in a part by the up-regulation of the pan-proteinase inhibitor A2M. To our knowledge, this is the first study reporting the expression of A2M by VSMC and the involvement of NR4A receptors in its transcriptional regulation.

## Materials and methods

See a detailed description of the different experimental procedures in the Suppl. Material available online at [www.thrombosis-online.com](http://www.thrombosis-online.com).

### Human artery sampling and preservation

The study was approved by the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (HSCSP) Ethics Committee and was conducted according to the Declaration of Helsinki. Coronary arteries (n=7) and internal mammary arteries (IMA) (n=8) were collected from patients undergoing heart transplant and coronary artery bypass-graft surgery, respectively. Arteries were dissected, immersed in cell maintenance media and cleaned of connective tissue and fat. Specimens for immunohistochemical studies were fixed overnight in 4% paraformaldehyde/0.1 M PBS (pH 7.4), embedded in paraffin and sectioned into 5 µm sections with a microtome (Jung RM2055, Leica, Wetzlar, Germany). Specimens for Western blot analysis were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at –80°C until the preparation of protein extracts.

### Cell culture

VSMC were obtained from mice aorta (19, 23) and human non-atherosclerotic coronary arteries of hearts removed in transplant operations at the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Barcelona, Spain) by a modification of the explant technique (23). All the procedures were approved by the Reviewer Institutional Committee on Human Research of the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau and conform to the Declaration of Helsinki. VSMC (from 3rd to 5th passages) were cultured in M199 (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 20% fetal calf serum (FCS; Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel), 2%

human serum, 2 mmol/l L-glutamine and antibiotics (100 U/ml penicillin and 0.1 mg/ml streptomycin).

Mouse VSMC, HEK 293T and NIH/3T3 cells were cultured in DMEM supplemented with 10% FCS, glutamine and antibiotics.

### Generation of lentiviral expression vectors for human NR4A receptors

The full-length human NOR-1 (hNOR1) cDNA (GenBank Accession No. D78579) was excised by digestion with *EcoRI* from a pBlueScript-NOR1 construct (kindly provided by Dr. N Ohkura) (32). The human cDNAs for Nurr1 and Nur77 were amplified by PCR from VSMC stimulated with 10% FCS. Alternatively, lentiviral constructs containing NR4A mouse cDNAs linked to a FLAG sequence were generated from the plasmids pCMV5/NOR-1-FLAG, pCMV5/Nurr1-FLAG and pCMV5/Nurr77 kindly provided by Dr. J Hastie (Protein Phosphorylation Unit, Medical Research Council, University of Dundee, Dundee, UK) (33).

### siRNA transfection

Silencer predesigned small interfering RNAs (siRNA; Ambion, Life Technologies) were used in knockdown experiments. VSMC were transfected with siRNAs against Nur77 (Silencer™ Select; ID: s6679), Nurr1 (Silencer™ Select; ID: s9786), NOR-1 (Silencer™ Select; ID: s15541) and A2M (Silencer™ Select; ID: s820) or with the Silencer™ Negative Control #1 (siRandom; ID: 4390843). Transfection was carried out with a siRNA pool against each NR4A receptor at equal molarities (final concentration of each siRNA, 16.6 nM; total siRNA concentration, 50 nM) or a siRandom (50 nM), using 7.5 µl of Lipofectamine RNAiMax Reagent (Life Technologies). Alternatively, knockdown of individual genes was performed (final concentration, 50 nM). After transfection, VSMC were allowed to recover in complete media for 16 hours (h) and then serum deprived for 48 h. Finally, cells were processed for RNA and protein extraction. Gene knockdown was verified by real-time PCR and Western blot.

### Gene expression: real-time PCR

Total RNA was isolated using Ultraspec™ (Biotecx Laboratories, Houston, TX, USA) according to the manufacturer's recommendations. Total RNA (1 µg) was reverse-transcribed with the High Capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and random hexamers. Levels of mRNA were assessed by real-time PCR on an ABI PRISM 7900 sequence detector using TaqMan™ gene expression assays-on-demand (Applied Biosystems). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase was used as an endogenous control (19).

### Constructs, transient transfection and luciferase assays

NR4A expression plasmids were generated by cloning the cDNA encoding NR4A receptors generated as indicated above into the

pCMV5 vector. A EGFP expression plasmid (pCMV5-EGFP) was also generated by cloning the EGFP cDNA into the pCMV5 expression vector. A 2.0 kb fragment of human A2M promoter (nucleotides -1999 to +93) was generated by PCR and cloned into pGL3 vector (Promega, Madison, WI, USA) (pGL3/A2M-1999). A 2.0 kb fragment of mouse A2M promoter (nucleotides -2089 to -86, from the translation start site) was generated by PCR and cloned into pGL3 vector (Promega), similarly to the human A2M promoter construction.

NIH/3T3 cells were transfected using Lipofectamine<sup>TM</sup> (Invitrogen, Life Technologies) according to the manufacturer's protocol (34). In competition assays, we used a dominant negative Nurr1 derivative (pCMX/Nurr1<sup>EngR</sup>) or its mutated version without dominant negative activity (pCMX/Nurr1<sup>EngR/R334A</sup>) kindly provided by Prof. T. Perlmann (Ludwig Institute for Cancer Research, Stockholm, Sweden) (35).

### Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Nuclear extracts were obtained from VSMC as previously described (19). A double-stranded DNA probe containing the putative wild-type NBRE binding site present in human A2M promoter and its mutated form were generated from the annealing of the following single-stranded complementary oligonucleotides: NBRE-wild-type (WT) upper strand: 5'-GGCCATCAATGACCTTCCAGAGAAT-3' and lower strand: 5'-ATTCTCTGGAAAGGTCA<sup>1</sup>TGATGGCC-3'; NBRE-mutated (NBRE *mut*) upper strand: 5'-GGCCATCAATG<sup>1</sup>ct<sup>1</sup>TTCCAGAGAAT-3' and lower strand: 5'-ATTCTCTGGAAAG<sup>1</sup>Gaa<sup>1</sup>CATTGATGGCC-3' (wild-type and mutated NBRE sites are underlined and changes in the mutated probe are indicated in lower case letters). DNA probes were labelled with [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP using T4 polynucleotide kinase (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). EMSA assays were performed with nuclear extracts from VSMC transfected with lentiviral vectors expressing EGFP or NR4A receptors linked to a FLAG using the Novagen's EMSA Accessory kit. In competition assays a specific competitor oligonucleotide was used. For supershift assays, nuclear proteins were preincubated with 2  $\mu$ g of an antibody against FLAG (F1804, Sigma, St. Louis, MO, USA). Protein-DNA complexes were resolved by electrophoresis at 4°C on 5% polyacrylamide, 5% glycerol gels in 0.5X TBE. Gels were dried and subjected to autoradiography using a Storage Phosphor Screen (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Shifted bands were detected using a Typhoon 9400 scanner (Amersham Biosciences, GE Healthcare).

### MMP activity assays

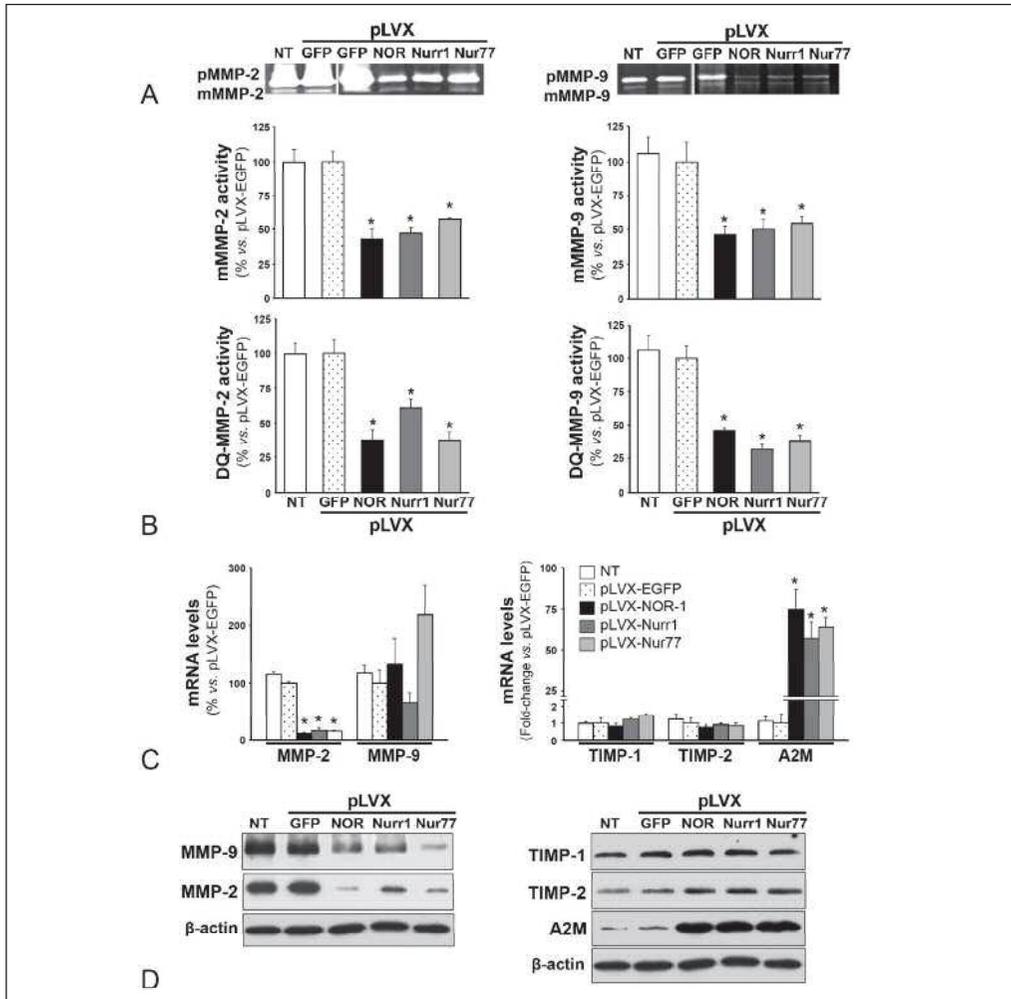
MMP activity was assessed by gelatin zymography on VSMC supernatants. NR4A-transduced VSMC were serum-deprived for 48 h, and cell supernatants were harvested. In some experiments, an anti-A2M antibody (HPA002265, Sigma) or a non-specific IgG were added during the last 24 h. Cell supernatants were dialysed against NaH<sub>4</sub>CO<sub>3</sub> 0.01 M overnight, at 4°C. For MMP-9 activity

determination supernatants were lyophilised in a centrifugal vacuum concentrator (SPD 111V SpeedVac; Thermo Electron Corp., Waltham, MA, USA) and resuspended in 25  $\mu$ l of RIPA buffer (Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM pH 8, 1% NP-40, 0.5% C<sub>22</sub>H<sub>35</sub>SO<sub>4</sub>Na, 0.1% SDS and protease inhibitors) (40X concentration). Cell supernatants were resolved by 10% SDS-polyacrylamide gels copolymerised with 1 mg/ml of gelatin A (Sigma) as a substrate. Gels were washed in a 2.5% (v/v) Triton X-100 solution (Sigma), incubated in reaction buffer (50 mM Tris, pH 7.5; 5 mM CaCl<sub>2</sub>; 0.02% sodium azide) and stained with Coomassie brilliant blue (Merck, Kenilworth, NJ, USA).

Alternatively, gelatinolytic activity was evaluated by a fluorogenic assay. Conditioned media was dialysed in 1X Reaction Buffer (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, sodium azide 0.2 mM; pH 7.6) and incubated (100  $\mu$ l) with DQ-gelatin (100  $\mu$ g/ml), a fluorescein conjugated substrate, for 24 h (EnzChek Gelatinase Assay kit; Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Fluorescence generated by the cleavage of DQ-gelatin was measured in the absence and in the presence of specific inhibitors to MMP-9 (MMP-9 inhibitor I; 100 nM; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) or MMP-2 (ARP100; 50 nM; Santa Cruz Biotechnology). Measurements were performed in a Spectra Max Gemini EM (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA; excitation wavelength: 495 nm; emission wavelength: 515 nm). Data represent the increase in fluorescence after subtraction of background fluorescence from a blank without protein. MMP-2 or MMP-9 activities were calculated as those inhibited by their respective inhibitors. Data was expressed as percentage of the activity exhibited by pLVX-EGFP transduced cells.

### Western blot analysis

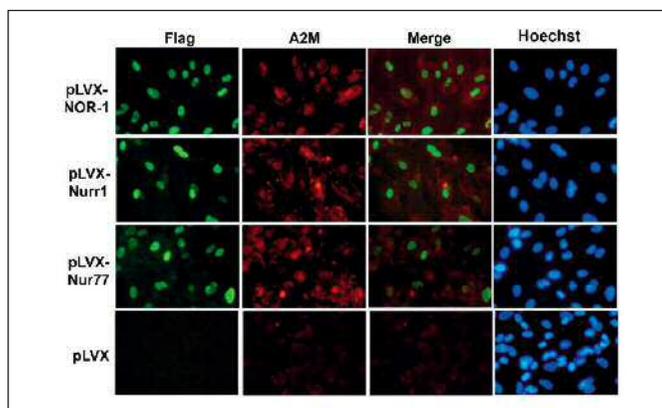
Protein extracts from human arteries were obtained using an ice-cold lysis buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1% (w/v) Triton X-100, 150 mM NaCl and 1 mM DTT, supplemented with phosphatase and protease inhibitors (Roche, Basel, Switzerland). Whole-cell extracts were obtained from VSMC (34). Protein concentration was measured by the BCA Protein Assay<sup>TM</sup> (Pierce, Rockford, IL, USA). In some experiments, supernatants from NR4A-transduced VSMC, concentrated using Amicon<sup>TM</sup> Ultra-4 centrifugal filters, were used. Proteins were resolved by SDS-PAGE under reducing conditions and transferred to Immobilon polyvinylidene difluoride membranes (Millipore, Billerica, MA, USA). Western blot analysis was performed using antibodies against A2M (HPA002265, Sigma), FLAG (F1804, Sigma), NOR-1 (H0008013-M6, Abnova, Taipei, Taiwan), Nurr1 (sc-991; Santa Cruz Biotechnologies), Nur77 (ab48789; Abcam), TIMP-1 (MAB13429; Chemicon Int), TIMP-2 (ab28260; Abcam), MMP-2 (ab51125; Abcam), MMP-9 (ab38898; Abcam) or  $\beta$ -actin (ab8226, Abcam). Detection was performed using the appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies from Santa Cruz Biotechnologies and the Supersignal<sup>TM</sup> detection system (Supersignal West Dura<sup>TM</sup>, Pierce) (34). Equal loading of protein in each lane was verified by Ponceau staining and by  $\beta$ -actin levels.



**Figure 1: NR4A over-expression reduces MMP-2 and MMP-9 activities.** A) Human VSMC were transfected with pLVX-EGFP (GFP), pLVX-NOR-1 (NOR), pLVX-Nurr1 (Nurr1) or pLVX-Nur77 (Nur77), and MMP-2 (left) and MMP-9 (right) gelatinolytic activities were analysed by zymography in cell supernatants. Bands corresponding to both zymogen (pMMP) and mature MMP (mMMP) forms are shown. Gelatinolytic activities in non-transduced cells (NT) were also analysed. B) Upper panels: Bars graphs depict the levels of the mature forms of MMP-2 (left panel) and MMP-9 (right panel) corresponding to gel zymography. Lower panels: Gelatinolytic activities in cell supernatants were also evaluated using the DQ-gelatin assay in the presence of inhibitors of MMP-2 (ARP100; left panel) or MMP-9 in-

hibitor I; right panel) to measure their specific activities. Differences in fluorescence intensity between samples with and without the specific inhibitors were determined. C) mRNA levels for MMP-2 and MMP-9 (left panel) and those for the proteinase inhibitors TIMP-1, TIMP-2 and A2M (right panel) were determined by real-time PCR. Data were normalized by GAPDH mRNA levels. D) Representative immunoblots showing protein levels of MMPs (MMP-2 and MMP-9) and those for the proteinase inhibitors (TIMP-1, TIMP-2 and A2M) in cell supernatants.  $\beta$ -actin levels in cell monolayers were used as a loading control. Results are expressed as mean  $\pm$  SD (n = 6),  $p < 0.01$ : \*, vs pLVX-EGFP.

**Figure 2: NR4A over-expression induces A2M protein levels in VSMC.** VSMC were transduced with the FLAG-tagged derivative forms of each NR4A receptor and the empty vector (pLVX). Immunofluorescence microscopy analysis showing FLAG-tagged NR4A receptors (green), A2M (red) and nuclei (blue) staining.



### Immunostaining of human arteries

Human arteries were fixed and cut as indicated above. Deparaffinised sections were rehydrated, subjected to antigen retrieval in 10 mM citrate buffer pH 6.0 (95 °C for 20 minutes [min]) and blocked for 30 min with 10% goat serum/phosphate-buffered saline (PBS). A rabbit anti-human A2M antibody (HPA002265, Sigma) and an antibody against  $\alpha$ -actin (ab5694; Abcam) were used. After extensive washes, sections were incubated with a biotinylated goat anti-rabbit secondary antibody (Vector, Burlingame, CA, USA). Immunocomplexes were detected after incubation with Vectastain Elite ABC reagent (PK6100, Vector) and DAB substrate (Roche). Images were acquired with an Olympus Vanox AHB3T microscope and digitalised by a Sony camera (DXC-S500). Negative control staining was achieved using rabbit sera in place of primary antibodies.

### Immunocytochemistry

NOR-1-, Nurr1- and Nur77-lentivirally transduced VSMC were cultured in glass-bottom dishes (Willco wells B.V., Amsterdam, The Netherlands) and fixed in ice-cold 4% paraformaldehyde for 15 min. After blocking, cells were incubated with anti-FLAG (F1804, Sigma) and anti-A2M (HPA002265, Sigma) antibodies in PBS containing 5% bovine serum albumin (BSA), overnight at 4°C. Alexa fluor 633 goat anti-rabbit and Alexa fluor 488 goat anti-mouse immunoglobulins were used as secondary antibodies (Molecular Probes). Controls without the primary antibody were included in all procedures. After extensive washing, cells were mounted with ProLong™ mounting medium (Molecular Probes) and analysed by confocal microscopy (Leica TCS SP2-AOBS). Images were taken from five random fields.

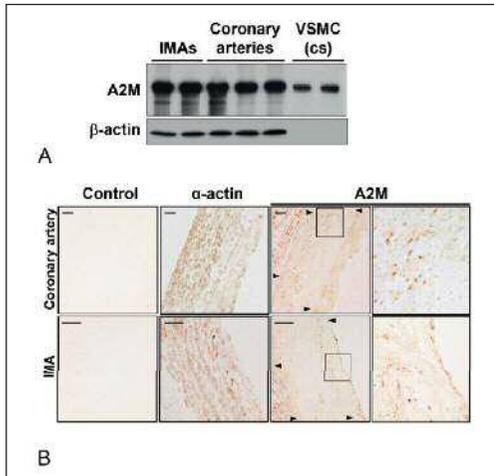
### Statistical analyses

Results are expressed as mean  $\pm$  SD. Significant differences were established by Student's t-test using the GraphPad InStat programme (V2.03, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

## Results

### NR4A induction reduces MMP activity in VSMC

To characterise the impact of NR4A on vascular MMP activity, human VSMC were transduced with recombinant lentivirus in order to over-express Nur77 (NR4A1), Nurr1 (NR4A2) and NOR-1 (NR4A3). Over-expression of NR4A receptors was verified by real time PCR and Western blot (Suppl. Figure 1, available online at [www.thrombosis-online.com](http://www.thrombosis-online.com)). Supernatants from NR4A-transduced cells exhibited a strong decrease in MMP-2 and MMP-9 activities compared to control cells as determined by zymography and DQ-gelatin assay (► Figure 1A and B). Real-time PCR analysis showed that over-expression of NR4A receptors down-regulated MMP-2 expression, but did not significantly affect MMP-9 mRNA levels (► Figure 1C, left panel). However, both MMP-2 and MMP-9 protein levels were down-regulated in VSMC supernatants (► Figure 1D, left panel). Neither mRNA nor protein levels of TIMP-1 and TIMP-2, two well-known MMPs inhibitors, were altered in NR4A-overexpressing cells (► Figure 1C and D, right panels). Conversely, mRNA levels of A2M, the major plasma proteinase inhibitor, were markedly induced by these receptors (► Figure 1C, right panel). Accordingly, A2M secretion into the cell culture media was significantly increased in NR4A transduced VSMC as evidenced by Western blot analysis from cell supernatants (► Figure 1D, right panel), and immunofluorescence microscopy (► Figure 2). As shown, FLAG-tagged NR4A transduced cells express high levels of A2M, while A2M immunoreactivity was low in VSMC transduced with the empty vector.



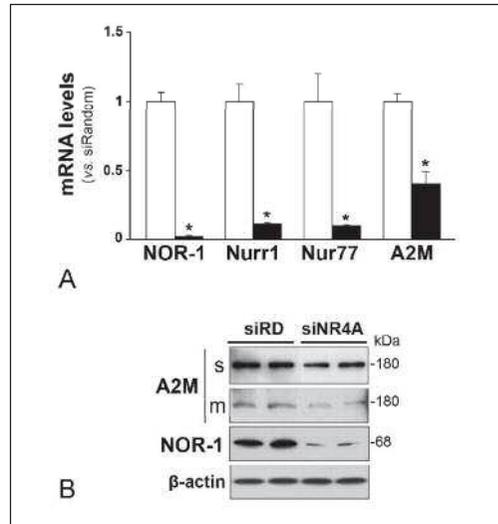
**Figure 3: A2M is expressed in human arteries.** A) Representative immunoblot showing A2M protein levels in internal mammary arteries (IMAs) (n=8), coronary arteries (n=7) and cell supernatants from human VSMC (n=6). B) Representative images showing the immunohistochemical analysis of A2M and  $\alpha$ -actin in human arteries (coronary artery and IMA). Left panels: negative controls. Right panels: high-power views of A2M staining in indicated areas. The positions of the internal and external elastic laminae are indicated by black arrowheads. Bars: 50  $\mu$ m.

### A2M is expressed in human arteries

To address the relevance of A2M in the vasculature, we examined the expression of A2M in human vascular tissues. IMA and coronary arteries express A2M at similar levels as determined by Western blot analysis (► Figure 3A). A2M protein levels were high in whole tissue extracts from these human arteries and cell supernatants from VSMC cultures also exhibit relevant A2M levels. Immunohistochemical analysis revealed A2M immunostaining in the adventitia, in the intima layer (endothelium and subendothelium), but also in the media layer (► Figure 3B, right panels). Immunostaining of consecutive sections using a VSMC marker (smooth muscle  $\alpha$ -actin) suggest that in the media of these non-atherosclerotic vessels VSMC seem to be the main source of A2M.

### NR4A are involved in the basal regulation of A2M expression in VSMC

To further evaluate the contribution of NR4A to the control of A2M expression, we performed knockdown experiments using a siRNA pool (siNR4A) against each NR4A receptor. The siNR4A pool reduces the steady state mRNA levels of NOR-1, Nurrl1, and Nurrl7 as determined by real-time PCR. Interestingly, the knockdown of NR4A receptors produced a significant reduction in A2M mRNA levels (about 60%) (► Figure 4A). Consequently, A2M



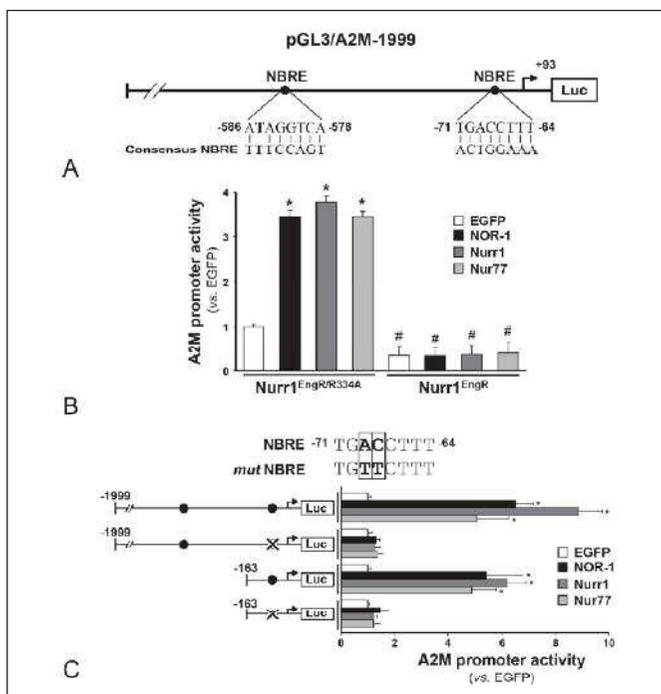
**Figure 4: NR4A knockdown downregulates A2M expression.** A) VSMC were transfected with a pool of siRNAs against each specific NR4A receptor (siNR4A; black bars) or a control siRNA (siRD; white bars). The expression of each NR4A receptor and that of A2M in these samples was analysed by real-time PCR. The siNR4A pool reduced NOR-1, Nurrl1 and Nurrl7 mRNA levels. mRNA levels were expressed relative to those detected in siRD transfected cells (value=1). Data normalised by GAPDH mRNA levels are expressed as mean  $\pm$  SD (n=6),  $p < 0.05$ ; \*, vs siRandom. B) Levels of A2M were analysed by Western blot in VSMC supernatants (s) and VSMC monolayers (m) from the same cells. NOR-1 protein levels are also shown.  $\beta$ -actin levels in cell monolayers were used as a loading control.

protein levels decreased in both VSMC supernatants and VSMC monolayers (about 50%) (► Figure 4B). NOR-1 protein levels analysed by Western blot confirmed the efficiency of siRNA blocking the expression of NR4A receptors (► Figure 4B). When NR4A receptors were individually silenced the reduction of A2M mRNA levels was still significant, but lower than that observed simultaneously inhibiting the three receptors (Suppl. Figure 2, available online at [www.thrombosis-online.com](http://www.thrombosis-online.com)).

### NR4A induce A2M promoter activity

Data described above suggest that NR4A receptors participate in the control of A2M transcription. *In silico* analysis revealed the presence of two putative NBRE binding sites in A2M promoter. As shown in ► Figure 5A, the most proximal putative NBRE is fully conserved compared with the consensus sequence. To analyse the functionality of these elements, NIH/3T3 cells were transiently co-transfected with a pGL3 luciferase reporter plasmid harbouring 1,999 bp of A2M promoter (pGL3/A2M-1999) and pCMV5-expression vectors for each NR4A receptor or EGFP. As shown in ► Figure 5B and C, NR4A receptors induced A2M transcriptional

**Figure 5: A2M promoter activity is regulated by NR4A receptors.** A) Schematic representation of the A2M proximal promoter region cloned in the pGL3 Luciferase reporter vector (pGL3/A2M-1999). The two putative NBRE elements identified by *in silico* analysis are highlighted. The consensus sequence for NBRE site is indicated and non-conserved bases are shown in bold. B) Luciferase activity evaluated in NIH/3T3 cells co-transfected with the pGL3/A2M-1999 Luciferase construct, pCMV5-expression vectors encoding for NOR-1, Nurr1, Nur77 or EGFP and a dominant negative Nurr1 derivative (Nurr1<sup>EngR</sup>) or its mutated version that has lost its DNA binding capacity (Nurr1<sup>EngR/R334A</sup>). Data are expressed as mean  $\pm$  SD (n=6), p<0.001: \*, vs cells transfected with the pCMV5-EGFP expression vector; p<0.01: #, vs cells transfected with the same pCMV5 construct and the Nurr1<sup>EngR/R334A</sup> mutant. C) Cells were transiently co-transfected with NR4A or EGFP pCMV5-expression vectors together with pGL3/A2M-1999 or pGL3/A2M-163 Luciferase constructs. The core consensus of the NBRE site (-71/-64) is indicated and changes introduced by mutagenesis on both Luciferase constructs are boxed. The activity of constructs mutated in the NBRE site (deleted white circle) is also shown. Data are expressed as mean  $\pm$  SD (n= 6), p<0.001: \*, vs cells co-transfected with pCMV5-EGFP and the same Luciferase promoter construct.



activity. To deepen the involvement of NR4A in A2M promoter trans-activation, a dominant negative Nurr1 derivative, Nurr1<sup>EngR</sup> (35) was used. In these assays, Nurr1<sup>EngR</sup> completely blocked the NR4A-mediated induction of A2M promoter activity (► Figure 5B). The contribution of each putative NBRE to the NR4A-dependent A2M regulation was established by promoter deletion and site-directed mutagenesis studies. As shown in ► Figure 5C, the up-regulation of A2M promoter activity elicited by NR4A was not affected by the deletion of the distal putative NBRE site. Moreover, mutation of the proximal site (-71/-64) in both the longer (pGL3/A2M-1999) and the shorter (pGL3/A2M-163) promoter constructs completely abrogated the NR4A-dependent induction of A2M promoter activity (► Figure 5C), supporting that the proximal NBRE site (-71/-64) confers NR4A-responsiveness.

#### NR4A are recruited to a canonical NBRE consensus site in the A2M promoter

To further characterise the functionality of the NBRE (-71/-64) site, we performed EMSAs using nuclear extracts from human VSMC transfected with FLAG-tagged forms of each NR4A receptor. As shown in ► Figure 6A, a differential pattern of re-

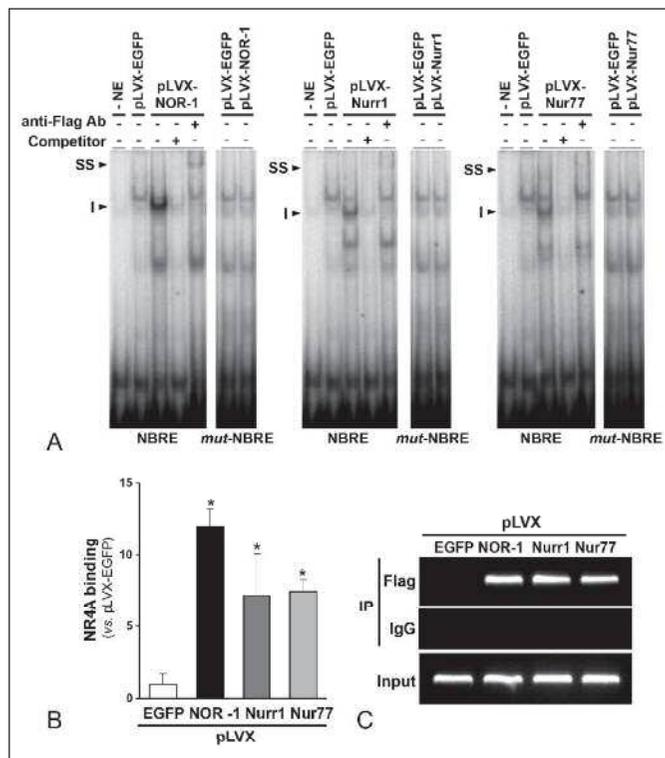
tarded bands was observed in EMSAs carried out using nuclear extracts from NOR-1-, Nurr1- and Nur77-transduced cells respect those of nuclear extracts from control cells (transduced with pLVX/EGFP). NR4A over-expression increased the intensity of one of these complexes, that was competed by an excess of unlabelled probe and was supershifted by an anti-FLAG antibody, indicating the binding of these receptors to this probe. Conversely, mutation of the NBRE probe abrogated the enhanced binding found in NR4A-transduced cells. Taken together, these data demonstrate that NR4A receptors specifically bind to this NBRE site. To confirm that NR4A actually binds to the A2M promoter *in vivo*, ChIP assays were performed in VSMC expressing FLAG-tagged NR4A receptors. NR4A receptors directly bound to chromatin were immunoprecipitated using an anti-FLAG antibody. Conventional and real-time PCR were used to amplify a 171 bp genomic region (-183 to -12) surrounding the NBRE site of A2M promoter (-71/-64). Consistent with data from EMSA, ChIP assays demonstrated that NR4A receptors specifically bind to the A2M promoter region encompassing the NBRE site (► Figure 6B and C). A control IgG did not precipitate detectable DNA and pre-immunoprecipitation samples evidenced equivalent DNA input (► Figure 6C).

## NR4A-induced A2M inhibits MMP activity in VSMC

To assess whether the increased secretion of A2M participates in the inhibition of MMP activity induced by NR4A receptors, we analysed whether a blocking antibody against A2M could reverse this effect. This antibody recognises A2M epitopes near the bait region, an exposed stretch located at the middle of the polypeptide chain that is key in the initiation of the complex A2M-proteinase (36). Because MMP activity was similarly regulated by the three NR4A receptors, these experiments were only performed in NOR-1-transduced VSMC. As shown in ►Figure 7, gel zymography analysis revealed that the reduction in MMP-2 and MMP-9 activities evoked by NOR-1 over-expression was significantly prevented by this anti-A2M antibody (►Figure 7A and B). This effect was confirmed determining MMP-2 and MMP-9 activities by the DQ-gelatin assay (►Figure 7C). Finally, A2M silencing produced a similar effect on VSMC gelatinase activity (Suppl. Figure 3, available online at [www.thrombosis-online.com](http://www.thrombosis-online.com)). Therefore, these results suggest that NR4A might indirectly modulate MMP activity through the up-regulation of A2M.

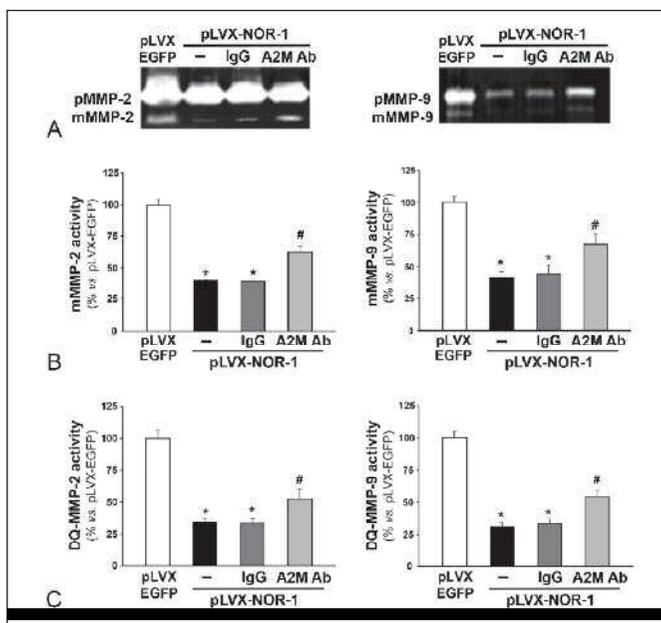
## NR4A modulates MMP expression in the vascular wall

We aimed to analyse the *in vivo* modulation of A2M by NR4A receptors using a transgenic model that specifically over-express human NOR-1 in VSMC (TgNOR-1) (19). However, in contrast to human A2M promoter, mouse A2M promoter was unresponsive to NR4A receptors. Indeed, the NBRE response element identified in human A2M promoter is not conserved in mouse A2M promoter (Suppl. Figure 4A, available online at [www.thrombosis-online.com](http://www.thrombosis-online.com)). Further, NOR-1 over-expression did not affect the transcriptional activity of mouse A2M promoter (Suppl. Figure 4B, available online at [www.thrombosis-online.com](http://www.thrombosis-online.com)), and accordingly A2M expression levels were unaffected by NOR-1 over-expression in either aorta (Suppl. Figure 4C, available online at [www.thrombosis-online.com](http://www.thrombosis-online.com)) or VSMC cultures (Suppl. Figure 4D, available online at [www.thrombosis-online.com](http://www.thrombosis-online.com)) from TgNOR-1. Interestingly, however, we found that NOR-1 transgenesis down-regulated basal expression of MMP-2 in mouse vascular wall, and reduced the up-regulation of this MMP in response to LPS challenge (Suppl. Figure 5A, available online at [www.thrombosis-online.com](http://www.thrombosis-online.com)).



**Figure 6: NR4A receptors bind to the A2M promoter.** A) Representative autoradiograms of EMSA performed with the A2M (-80/-55) probe and nuclear protein extracts from VSMC transduced with lentiviral vectors to express EGFP (pLVX-EGFP), NOR-1-FLAG (pLVX-NOR-1; left panel), Nurr1-FLAG (pLVX-Nurr1; middle panel) or Nur77-FLAG (pLVX-Nur77; right panel). The position of the complex up-regulated by NR4A receptors is indicated (I). Competition assays with a molar excess of unlabelled probe (100-fold) and supershift assays with a specific antibody against the FLAG sequence were performed. EMSA carried out with a mutated NBRE probe is also shown. (- NE: without nuclear extract; SS: supershift). B and C) The relative *in vivo* association of NR4A receptors with the human A2M promoter was analysed by Chromatin immunoprecipitation (ChIP) in VSMC transduced with pLVX-EGFP or the lentiviral FLAG-tagged forms of each NR4A receptor (pLVX-NOR-1, pLVX-Nurr1 and pLVX-Nur77). Immunoprecipitations were performed with an antibody against the FLAG sequence or a non-specific IgG. The bars graph shows the enrichment of NR4A quantified by real-time PCR using A2M promoter specific primers. Data were normalised to the total input DNA and are represented as mean  $\pm$  SD.  $p < 0.05$ ; \*, vs pLVX-EGFP. The panel on right shows the agarose gel electrophoresis of PCR products. Equal input DNA and control IgG immunoprecipitations are shown.

**Figure 7: An A2M specific antibody attenuates the inhibition of MMP activities produced by NR4A over-expression.** VSMC were transduced with pLVX-EGFP or pLVX-NOR-1 and an A2M specific antibody (A2M Ab) was added for 24 h to cells cultured in serum-free medium. A) MMP-2 and MMP-9 gelatinolytic activities were assessed in cell supernatants by gel zymography. Positions of zymogens (pMMP-2) and their corresponding mature forms (mMMP) are indicated. B) Bars graphs depict the levels of the active MMPs forms (mature) corresponding to gel zymographies shown in (A). C) Alternatively MMP-2 and MMP-9 gelatinolytic activities were determined in conditioned medium using the DQ-gelatin assay in the presence of specific inhibitors of MMP-2 (ARP100) or MMP-9 (MMP-9 inhibitor I). Differences in fluorescence intensity between samples with and without the specific inhibitors were determined. Data are expressed as a mean  $\pm$  SD ( $n = 6$ ),  $p < 0.05$ : \*, vs pLVX-EGFP;  $p < 0.05$ : #, vs pLVX-NOR-1 transduced cells in absence of the A2M Ab.



com). Similarly LPS-induced MMP-9 expression was strongly reduced in the vascular wall of TgNOR-1 animals compared to controls (wild-type littermates) (Suppl. Figure 5B, available online at [www.thrombosis-online.com](http://www.thrombosis-online.com)).

## Discussion

NR4A receptors have been shown to regulate biological processes such as cell survival and differentiation, apoptosis and metabolism (20, 27), and have been implicated in a variety of high-incidence human pathologies including obesity, diabetes, cardiovascular disease and cancer (20, 27, 37, 38). Recent works have highlighted the role of these receptors in inflammation (39). However, and despite the increasing evidence that they are key players in vascular biology, only relatively few NR4A target genes have been described in vascular cells so far. In this study we used both gain- and loss-of-function approaches to identify NR4A target genes responsible for the modulation of MMPs, proteases critically involved in vascular remodelling. We evidence that, in human VSMC, NR4A receptors modulate MMP activity by different mechanisms including the up-regulation of A2M. A2M is a main member of alpha-macroglobulin family and one of the major antiproteases present in the plasma of vertebrates (6). Our Western blot and immunohistochemical analysis demonstrate that A2M is expressed in the vascular wall, not only in adventitial fibroblasts but also in the media

and in the endothelium. A2M has been extensively documented in fibroblasts from different origin (10), and it has been detected in cardiac endothelium and in the endothelium from small blood vessels (40, 41), but until now it has not been described the presence of A2M in the human arterial wall. Furthermore, to our knowledge this is the first study reporting the expression of A2M by human VSMC and the involvement of NR4A receptors in its transcriptional regulation.

It has been previously shown that transgenic mice over-expressing Nur77 (NR4A1) in VSMC exhibited low MMP-2 levels in remodeled carotid arteries (42). We analyse MMP activity in human VSMC transduced with lentiviral vectors expressing NR4A receptors. The activity of two gelatinases (MMP-2 and MMP-9) was reduced in supernatants from VSMC over-expressing NR4A receptors. Our results from human VSMC in culture confirm the down-regulation of MMP-2 mRNA levels by Nur77, and extended this ability to the two other members of the NR4A subfamily. Further, data from a mouse model that specifically over-express NOR-1 in VSMC challenged with LPS suggest the ability of these receptors to modulate MMP-2 and MMP-9 expression *in vivo*. Although we do not address the specific mechanism underlying the down-regulation of MMPs by NR4A receptors, it is well known that these receptors can inhibit gene expression by several mechanisms including the transcriptional antagonism with other transcription factors, as has been described for Nur1-mediated MMP-1 inhibition in cartilage (31). Interestingly, NR4A receptors also exert anti-

inflammatory effects impairing NFκB signalling pathway through different mechanisms and thereby negatively modulating NFκB target genes in vascular and non-vascular cells (43–45). Because MMP-2 and MMP-9 are regulated by NFκB in VSMC (46), the anti-inflammatory activity of NR4A receptors could explain the observed modulation of these MMPs. The potential effects of NR4A receptors on MMPs seem to be even more complex as we observed a decrease of MMP-9 in cell supernatants from human VSMC over-expressing NR4A receptors, although MMP-9 mRNA levels remained unchanged, suggesting an effect on MMP-9 post-transcriptional processing and/or on MMP-9 secretion. Finally, it should be noted that direct transactivation of some MMP family members like MMP-13 (by Nurr1) has been described in human synoviocytes (47). Therefore, further studies are warranted to better understand all mechanisms underlying the regulation of MMPs by NR4A receptors in different tissues.

Because MMP inhibitors are instrumental in modulating the MMP activity we analysed the levels of two common TIMPs (TIMP-1 and TIMP-2). Although Nur77 seems to modulate TIMP-2 expression in some tissues (48), neither the expression of TIMP-1 nor that of TIMP-2 (mRNA and protein levels) was modified by NR4A receptors in VSMC. Surprisingly, the expression of the pan-protease inhibitor A2M was strongly induced by NR4A receptors as we assessed by real-time PCR, Western blot analysis and immunohistochemistry. Whereas NR4A over-expression induced A2M, NR4A knockdown significantly reduced basal A2M expression. A2M is a broad-spectrum protease inhibitor that inactivates MMPs but also serine-, cysteine- and aspartic- proteases (5). It has been shown that Nur77 is able to induce the expression of other protease inhibitors such as the serine protease inhibitor

(serpin) E1 (plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1) in human endothelial cells (30), and serpin A3 (alpha 1-antichymotrypsin) in HepG2 cells (49). Therefore, by regulating the expression of different proteinase inhibitors NR4A receptors could indirectly modulate multiple physiological processes ranging from fibrinolysis to vascular remodelling.

We analysed the transcriptional mechanisms responsible for the up-regulation of A2M by NR4A receptors. *In silico* analysis of A2M promoter revealed the presence of two putative NBRE sites. Competition assays with a NR4A dominant negative suggested the involvement of at least one of these two NBRE binding sites in the NR4A-induced A2M transcriptional activation. Accordingly, serial promoter deletion and site-directed mutagenesis analysis identified the proximal NBRE site (-71/-64) as crucial for the NR4A-mediated induction of A2M promoter activity. In fact, the direct binding of the three NR4A receptors to this site was demonstrated *in vitro* and *in vivo* by EMSA and ChIP assays. Previous studies have characterised several functional transcription factor binding sites in the A2M promoter that control A2M expression in different cell types, among them members of the STAT family (50). Our results involving NR4A receptors in the regulation of A2M expand the knowledge on the A2M promoter structure and regulation.

Experiments using an antibody or a siRNA against A2M support that the induction of A2M by NR4A receptors contributes, at least in a part, to the decrease in MMP activity observed in supernatants from NR4A-transduced VSMC. Inhibition of MMPs is only a minor part of the multiple activities exhibited by A2M. Indeed, A2M is unique among proteinase inhibitors in its ability to block virtually any proteinase, regardless of its specificity, and catalytic mechanism. The primary function of A2M is the physical entrapment or sequestration of proteinases, and thereby it is able to regulate processes such as the extracellular proteolytic activity resulting from clotting and fibrinolysis, and proteinase activity during inflammatory events (reviewed in [6]). It has been suggested that A2M may function as a scavenger of defensins and other peptide mediators in inflamed tissues and may constitute an important mechanism for the regulation and containment of inflammation (6). Furthermore, A2M binds several cytokines involved in inflammation and wound repair (i.e. basic fibroblasts growth factor and platelet-derived growth factor) modulating their activity directly or indirectly acting as a carrier and preventing the binding of these molecules to their receptors (6). Therefore, the consequences of A2M up-regulation by NR4A receptors in VSMC could exceed those derived from the inhibition of MMPs.

In summary, we show that NR4A are able to temper MMP-2 and MMP-9 expression acting through different mechanisms, and that human VSMC express A2M, a target of NR4A receptors that could mediate, at least in a part, the inhibition of MMP activity promoted by these receptors. Because of the wide spectrum of A2M effects in inflammation and wound repair, it is tempting to speculate that up-regulation of A2M by NR4A receptors could contribute to the mechanisms by which these receptors modulate such processes. Further studies should be conducted to fully understand the consequences of A2M up-regulation by NR4A

### What is known about this topic?

- NR4A receptors regulate VSMC spreading, proliferation and apoptosis and play a critical role in atherosclerosis.
- NR4A receptors have recently been involved in the regulation of MMPs in non-vascular tissues by transcriptional repression mechanisms. However, its role in the control of MMP activity in vascular cells is still unclear.

### What does this paper add?

- NR4A over-expression in human VSMC strongly decreases MMP-2 and MMP-9 activities. This effect was linked to the down-regulation of MMP-2 expression and to a decreased MMP-2 and MMP-9 protein levels.
- NR4A over-expression also modulates MMP activity through an unconventional mechanism related with the up-regulation of the pan-proteinase inhibitor alpha-2-macroglobulin (A2M).
- Our study evidences the expression of A2M in different vascular beds and its relevant secretion by VSMC.
- NR4A receptors induce A2M expression acting on a NBRE response element present in A2M proximal promoter as evidence by different molecular biology approaches.

receptors in VSMC physiology and vascular remodelling associated to cardiovascular diseases.

#### Acknowledgements

We are grateful to Prof. Naganari Ohkura (Growth Factor Division, National Cancer Center Research Institute, Tokyo, Japan) for kindly providing us with the human NOR-1 cDNA. We are indebted to Prof. James Hastie and Prof. Hilary McLauchlan (Division of Signal Transduction Therapy, Medical Research Council, University of Dundee, Scotland) for kindly providing us with the pCMV-FLAG-Nur77, pCMV-FLAG-Nurr1 and pCMV-FLAG-NOR-1 constructs. We thank Prof. T. Perlmann (Ludwig Institute for Cancer Research, Stockholm, Sweden) for kindly providing us with pCMX/Nurr1<sup>EngR</sup> and pCMX/Nurr1<sup>EngR/R334A</sup> constructs.

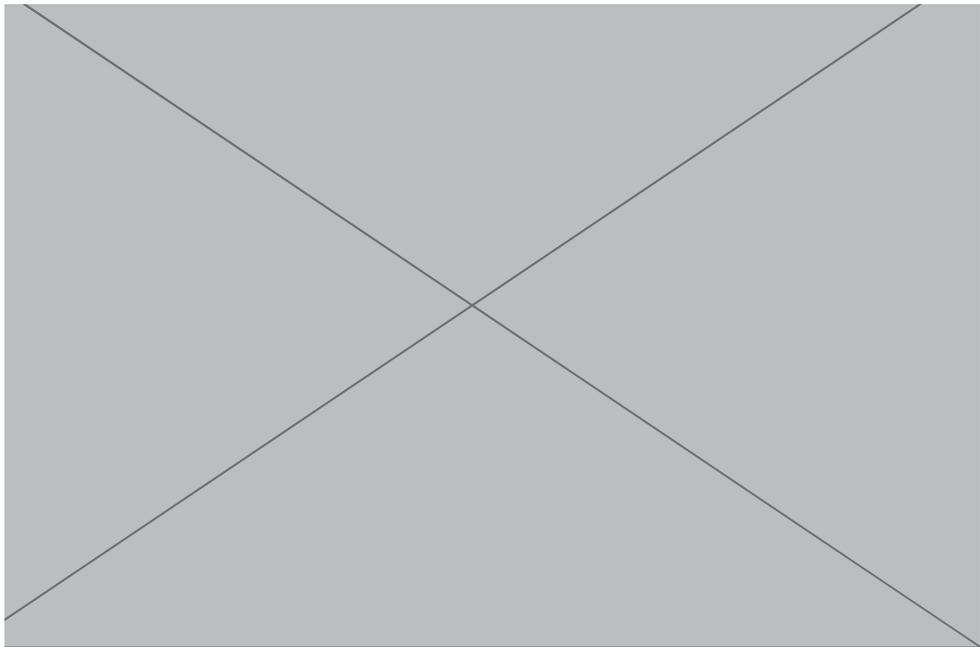
#### Conflicts of interest

None declared.

#### References

- Schober A, Zerneck A. Chemokines in vascular remodelling. *Thromb Haemost* 2007; 97: 730–737.
- Renna NF, de Las Heras N, Miatello RM. Pathophysiology of vascular remodelling in hypertension. *Int J Hypertens* 2013; 2013: 808353.
- Chen Q, Jin M, Yang F, et al. Matrix metalloproteinases: inflammatory regulators of cell behaviors in vascular formation and remodelling. *Mediators Inflamm* 2013; 2013: 928315.
- Ketelhuth DF, Bäck M. The role of matrix metalloproteinases in atherothrombosis. *Curr Atheroscler Rep* 2011; 13: 162–169.
- Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 2006; 69: 562–573.
- Rehman AA, Ahsan H, Khan FH.  $\alpha$ -2-Macroglobulin: a physiological guardian. *J Cell Physiol* 2013; 228: 1665–1675.
- Schmidt B, Mitchell L, Ofosu FA, et al. Alpha-2-macroglobulin is an important progressive inhibitor of thrombin in neonatal and infant plasma. *Thromb Haemost* 1989; 62: 1074–1077.
- Schaller J, Gerber SS. The plasmin-antiplasmin system: structural and functional aspects. *Cell Mol Life Sci* 2011; 68: 785–801.
- Ossege LM, Voss B, Müller KM. Expression and secretion of alpha-2-macroglobulin by dust-stimulated alveolar macrophages. *Pneumologie* 1994; 48: 236–239.
- Boel E, Kristensen T, Petersen CM, et al. Expression of human alpha 2-macroglobulin cDNA in baby hamster kidney fibroblasts: secretion of high levels of active alpha 2-macroglobulin. *Biochemistry* 1990; 29: 4081–4087.
- Shi DL, Savona C, Gagnon J, et al. Transforming growth factor-beta stimulates the expression of alpha 2-macroglobulin by cultured bovine adrenocortical cells. *J Biol Chem* 1990; 265: 2881–2887.
- Stouffer GA, LaMarre J, Gonias SL, et al. Activated alpha 2-macroglobulin and transforming growth factor-beta 1 induce a synergistic smooth muscle cell proliferative response. *J Biol Chem* 1993; 268: 18340–18344.
- Ikari Y, Fujikawa K, Yee KO, et al. Alpha(1)-proteinase inhibitor, alpha(1)-antichymotrypsin, or alpha(2)-macroglobulin is required for vascular smooth muscle cell spreading in three-dimensional fibrin gel. *J Biol Chem* 2000; 275: 12799–12805.
- Ikari Y, Mulvihill E, Schwartz SM. alpha 1-Proteinase inhibitor, alpha 1-antichymotrypsin, and alpha 2-macroglobulin are the antiapoptotic factors of vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 11798–11803.
- Martínez-González J, Rius J, Castelló A, et al. Neuron-derived orphan receptor-1 (NOR-1) modulates vascular smooth muscle cell proliferation. *Circ Res* 2003; 92: 96–103.
- Arkenbout EK, de Waard V, van Bragt M, et al. Protective function of transcription factor TR3 orphan receptor in atherogenesis: decreased lesion formation in carotid artery ligation model in TR3 transgenic mice. *Circulation* 2002; 106: 1530–1535.
- Bonta PI, van Tiel CM, Vos M, et al. Nuclear receptors Nur77, Nurr1, and NOR-1 expressed in atherosclerotic lesion macrophages reduce lipid loading and inflammatory responses. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 2288–2294.
- Nomiyama T, Zhao Y, Gizard F, et al. Deficiency of the NR4A neuron-derived orphan receptor-1 attenuates neointima formation after vascular injury. *Circulation* 2009; 119: 577–586.
- Rodríguez-Calvo R, Guadall A, Calvayrac O, et al. Over-expression of neuron-derived orphan receptor-1 (NOR-1) exacerbates neointimal hyperplasia after vascular injury. *Hum Mol Genet* 2013; 22: 1949–1959.
- Martínez-González J, Badimon L. The NR4A subfamily of nuclear receptors: new early genes regulated by growth factors in vascular cells. *Cardiovasc Res* 2005; 65: 609–618.
- Wang Z, Benoit G, Liu J, Prasad S, et al. Structure and function of Nurr1 identifies a class of ligand-independent nuclear receptors. *Nature* 2003; 423: 555–560.
- Liu D, Jia H, Holmes DI, Stannard A, et al. Vascular endothelial growth factor-regulated gene expression in endothelial cells: KDR-mediated induction of Egr3 and the related nuclear receptors Nur77, Nurr1, and Nor1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 2002–2007.
- Churchman AT, Siow RC. Isolation, culture and characterisation of vascular smooth muscle cells. *Methods Mol Biol* 2009; 467: 127–138.
- Nomiyama T, Nakamachi T, Gizard F, et al. The NR4A orphan nuclear receptor NOR1 is induced by platelet-derived growth factor and mediates vascular smooth muscle cell proliferation. *J Biol Chem* 2006; 281: 33467–33476.
- Martorell L, Martínez-González J, Crespo J, et al. Neuron-derived orphan receptor-1 (NOR-1) is induced by thrombin and mediates vascular endothelial cell growth. *J Thromb Haemost* 2007; 7: 1766–1773.
- Martorell L, Martínez-González J, Rodríguez C, et al. Thrombin and protease-activated receptors (PARs) in atherothrombosis. *Thromb Haemost* 2008; 99: 305–315.
- Zhao Y, Brummer D. NR4A orphan nuclear receptors: transcriptional regulators of gene expression in metabolism and vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30: 1535–1541.
- Martorell L, Gentile M, Rius J, Rodríguez C, et al. The hypoxia-inducible factor 1/NOR-1 axis regulates the survival response of endothelial cells to hypoxia. *Mol Cell Biol* 2009; 29: 5828–5842.
- Thakar RG, Cheng Q, Patel S, et al. Cell-shape regulation of smooth muscle cell proliferation. *Biophys J* 2009; 96: 3423–3432.
- Gruber F, Hufnagl P, Hofer-Warbinek R, et al. Direct binding of Nur77/NAK-1 to the plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) promoter regulates TNF alpha-induced PAI-1 expression. *Blood* 2003; 101: 3042–3048.
- Mix KS, Attur MG, Al-Mussawir H, et al. Transcriptional repression of matrix metalloproteinase gene expression by the orphan nuclear receptor NURR1 in cartilage. *J Biol Chem* 2007; 282: 9492–9504.
- Ohkura N, Ito M, Tsukada T, et al. Structure, mapping and expression of a human NOR-1 gene, the third member of the Nur77/NGFI-B family. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1308: 205–214.
- Wingate AD, Campbell DG, Peggie M, et al. Nur77 is phosphorylated in cells by RSK in response to mitogenic stimulation. *Biochem J* 2006; 393: 715–724.
- Calvayrac O, Rodríguez-Calvo R, Alonso J, et al. CCL20 is increased in hypercholesterolemic subjects and is upregulated by LDL in vascular smooth muscle cells: role of NF- $\kappa$ B. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011; 31: 2733–2741.
- Castro DS, Hermanson E, Joseph B, et al. Induction of cell cycle arrest and morphological differentiation by Nurr1 and retinoids in dopamine MN9D cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 43277–43284.
- Sottrup-Jensen L, Sand O, Kristensen L, et al. The alpha-macroglobulin bait region. Sequence diversity and localisation of cleavage sites for proteinases in five mammalian alpha-macroglobulins. *J Biol Chem* 1989; 264: 15781–15789.
- Pei L, Waki H, Vaitheesvaran B, et al. NR4A orphan nuclear receptors are transcriptional regulators of hepatic glucose metabolism. *Nat Med* 2006; 12: 1048–1055.
- Mohan HM, Aherne CM, Rogers AC, et al. Molecular pathways: the role of NR4A orphan nuclear receptors in cancer. *Clin Cancer Res* 2012; 18: 3223–3228.
- McMorrow JP, Murphy EP. Inflammation: a role for NR4A orphan nuclear receptors? *Biochem Soc Trans* 2011; 39: 688–693.

40. Sayegh RA, Tao XJ, Leykin L, et al. Endometrial alpha-2 macroglobulin; localization by in situ hybridisation and effect on mouse embryo development in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 4189–4195.
41. He H, McCartney DJ, Wei Q, et al. Characterisation of a murine alpha 2 macroglobulin gene expressed in reproductive and cardiovascular tissue. *Biol Reprod* 2005; 72: 266–275.
42. Bonta PI, Matlung HL, Vos M, et al. Nuclear receptor Nur77 inhibits vascular outward remodelling and reduces macrophage accumulation and matrix metalloproteinase levels. *Cardiovasc Res* 2010; 87: 561–568.
43. You B, Jiang YY, Chen S, et al. The orphan nuclear receptor Nur77 suppresses endothelial cell activation through induction of IkappaBalpha expression. *Circ Res* 2009;104:742–749.
44. Saijo K, Winner B, Carson CT, et al. A Nurr1/CoREST pathway in microglia and astrocytes protects dopaminergic neurons from inflammation-induced death. *Cell* 2009;137:47–59.
45. Harant H, Lindley IJ. Negative cross-talk between the human orphan nuclear receptor Nur77/NAK-1/TR3 and nuclear factor-kappaB. *Nucleic Acids Res* 2004;32:5280–5290.
46. Adaya R, Tan BK, Chen J, et al. Nuclear factor-kappaB induction by visfatin in human vascular endothelial cells: its role in MMP-2/9 production and activation. *Diabetes Care* 2008;31:758–760.
47. Mix KS, McMahon K, McMorrow JP, et al. Orphan nuclear receptor NR4A2 induces synoviocyte proliferation, invasion, and matrix metalloproteinase 13 transcription. *Arthritis Rheum* 2012;64:2126–2136.
48. Zhang X, Yan G, Diao Z, et al. NUR77 inhibits the expression of TIMP2 and increases the migration and invasion of HTR-8/SVneo cells induced by CYR61. *Placenta* 2012; 33: 561–567.
49. Zhao Y, Liu Y, Zheng D. Alpha 1-antichymotrypsin/SerpinA3 is a novel target of orphan nuclear receptor Nur77. *FEBS J* 2008; 275: 1025–1038.
50. Lerner L, Henriksen MA, Zhang X, et al. STAT3-dependent enhanceosome assembly and disassembly: synergy with GR for full transcriptional increase of the alpha 2-macroglobulin gene. *Genes Dev* 2003; 17: 2564–2577.



## **Supplementary Material to Rodríguez-Calvo, Ferrán et al. “NR4A receptors up-regulate the antiproteinase alpha-2 macroglobulin (A2M) and modulate MMP-2 and MMP-9 in vascular smooth muscle cells” (Thromb Haemost 2015; 113.6)**

### **Suppl. Material and Methods**

#### **Animals**

A transgenic animal model that over-expresses NOR-1 in VSMC was used (1). Both transgenic animals (TgNOR-1) and control littermates (wild-type) on a C57BL/6J genetic background were bred in the Animal Experimentation Unit (CSIC-ICCC). Fourteen TgNOR-1 and 14 wild-type male mice (2 months old) were randomly distributed into four experimental groups: TgNOR-1 mice which received lipopolysaccharide (LPS; 0.5 mg/kg; n=7) or vehicle (saline; n=7), and control mice which received LPS (0.5 mg/kg; n=7) or vehicle (saline; n=7). After 24 h of treatment, mice were euthanized under ketamine/medetomidine anaesthesia (75 mg/kg and 1 mg/kg, respectively). Then, aorta was excised, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Animal handling and disposal were performed in accordance with the principles and guidelines established by the American Physiological Society for animal research, and all procedures were approved by the Ethical Committee as stated in Law 5/1995, June 21st, passed by the Generalitat de Catalunya. Animals were taken care of and used according to the Spanish Policy for Animal Protection RD53/2013, which meets the European Union Directive 2010/63/UE on the protection of animals used for experimental and other scientific purposes.

#### **Generation of lentiviral expression vectors for human NR4A receptors and viral particles**

The full-length human NOR-1 (hNOR1) cDNA (GenBank Accession No. D78579) was excised by digestion with *EcoRI* from a pBlueScript-NOR1 construct (kindly provided by

Dr. N Ohkura) (2). The human cDNAs for Nurr1 and Nur77 were amplified by PCR from VSMC stimulated with 10% FCS. The primers used were: human Nurr1: 5'-AATGACTCGAGACAGACGCGGAGAACTCCTA-3' (forward; *Xho*I site is underlined) and 5'-ATTCTCTAGAGAGCTGAGACTGCTCACACG-3' (reverse; *Xba*I site is underlined); human Nur77: 5'-TCAGCGAATTCAGCAGAACAGGTGCAAG-3' (forward; *Eco*RI site is underlined) and 5'-TGCATTCTAGAGCAGGTGAGAAGGTGGAG-3' (reverse; *Xba*I site is underlined). Human NR4A cDNAs were cloned into pLVX-puro lentiviral vector. Alternatively, lentiviral constructs containing NR4A mouse cDNAs linked to a FLAG sequence were generated from the plasmids pCMV5/NOR-1-FLAG, pCMV5/Nurr1-FLAG and pCMV5/Nurr77 kindly provided by Dr. J Hastie (Protein Phosphorylation Unit, Medical Research Council, University of Dundee, Dundee, Scotland) (3). HEK 293T cells were transfected with these constructs or the empty pLVX-puro vector using Lenti-X™ Lentiviral Expression System kit (Clontech) according to manufacturer's instructions. After 48 h, culture supernatants containing viral particles were collected and filtered. Lentiviral transduction of VSMC was performed in the presence of polybrene (8 µg/ml). After puromycin selection, RNA, whole protein or nuclear extracts were obtained. Lentiviral constructs containing or not FLAG sequences yielded similar results, but the later were preferably used in Western blot, immunocytochemistry, chromatin immunoprecipitation and electrophoretic mobility shift assay (EMSA) analysis to facilitate the detection of the overexpressed proteins by using anti-FLAG antibodies. Empty pLVX and pLVX-EGFP lentivirus were used as controls obtaining similar results.

### **Constructs, transient transfection and luciferase assays**

A 2.0 kb fragment of human A2M promoter (nucleotides -1999 to +93) was generated by PCR and cloned into pGL3 vector (Promega) (pGL3/A2M-1999). The primers used were: 5'-ATGACTCACAGGGCATGATGT-3' (forward; placed upstream an internal

*NheI* at -1999/-1993) and 5'-AGGAGCTCGAGGAGAACAGAC-3' (reverse; *XhoI* site is underlined). The PCR product was digested with *NheI* and *XhoI* and cloned into pGL3 vector. A promoter deletion construct (-163 to +93; pGL3/A2M-163) was generated using the reverse primer indicated above and the following forward primer: 5'-AGCTGCTGTACGGTAAAAGTGAG-3' (The three first bases of a *SacI* site that is extended in A2M promoter is underlined). The putative NBRE site (-71/-64) present in A2M promoter was mutated using the QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene) according to the manufacturer's instructions. The primers used were: forward 5'-TGA CTATAAAATAGGCCATCAATGttCTTTCCAGAGAATGTT CAGAGAC-3', and reverse 5'-GTCTCTGAACATTCTCTGGAAGaaCATTGATGGCCTATTTATAGTCA-3' (the putative NBRE site is underlined and changes are indicated in lower case letters). *In silico* analysis of the mutated sequence confirm that no new response elements were introduced using this strategy. Wild-type and mutated sequences were confirmed by DNA sequencing. A 2.0 kb fragment of mouse A2M promoter (nucleotides -2089 to -86, from the translation start site) was generated by PCR, similarly to the human A2M promoter construction. The primers used were: 5'-TTGGTACCTGGAATGATCCTTTTCTTGGGACT-3' (forward) and 5'-ATGCTAGCGCTTTATGCAAACAGCGGGT-3' (reverse). The PCR product was digested with *KpnI* and *NheI* (restriction sites are underlined), and cloned into pGL3 vector (Promega). Sequences were confirmed by DNA sequencing.

NIH/3T3 cells were transfected using Lipofectamine™ (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol (4). EGFP (pCMV5-EGFP) or NR4A expression plasmids (pCMV5-NOR-1, pCMV5-Nurr1 or pCMV5-Nur77) were co-transfected together with luciferase reporter plasmids containing A2M promoter fragments. In competition assays, a dominant negative Nurr1 derivative (pCMX/Nurr1<sup>EngR</sup>) or its mutated version without dominant negative activity (pCMV5/Nurr1<sup>EngR/R334A</sup>) were used (5). Briefly,

transient transfections were performed in subconfluent cells seeded in 12 well/plates using 0.05 µg/well of the EGFP or NR4A expression plasmids, 0.5 µg/well of the luciferase reporter plasmid, 0.05 µg/well of pRL-SV40 (Promega) as an internal control, and 1.6 µl/well of Lipofectamine™ Reagent (Invitrogen). The DNA/liposome complexes were added to the cells for 6 h. Cells were washed once and maintained in growth medium for 24 h. The activities of firefly and renilla luciferases were determined in cell lysates using the Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega) and a luminometer (Orion I, Berthold Detection Systems) according to the manufacturer. Results were expressed as the ratio of firefly to renilla activity.

#### **Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay**

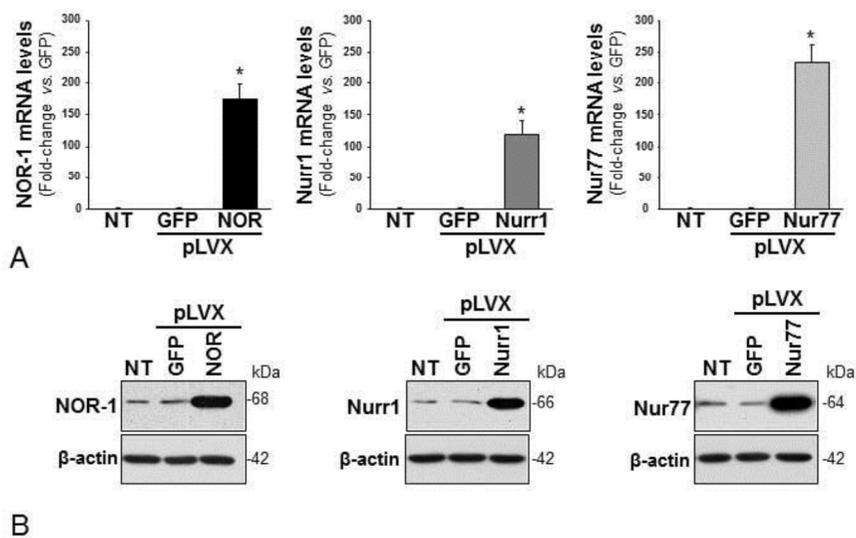
VSMC transduced with lentiviral vector expressing NR4A receptors or EGFP linked to a FLAG sequence were cross-linked with 1% formaldehyde for 10 min. The cross-link reaction was stopped by adding glycine (100 mM). Then, cells were extensively washed and lysed in LB1 buffer (50 mM Hepes-KOH, pH 7.5, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 0.3% Triton X-100, 10% glycerol) supplemented with protease inhibitors (Complete Protease Inhibitor Cocktail, Roche). After washing, nuclei were collected and resuspended in LB2 buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 0.1% Na-Deoxycholate, 0.5% N-lauroylsarcosine). Chromatin was sheared by sonication using Bioruptor™ UCD-200 and an aliquot was saved and stored as input DNA. Supernatants were then immunoprecipitated with 5 µg of anti-FLAG antibody (F1804, Sigma) or an IgG as a control. Immune complexes were recovered by addition of A/G-Agarose beads (Santa Cruz Biotechnologies). After washing, immune complexes were extracted in elution buffer (1% SDS, 100 mM NaHCO<sub>3</sub>, 200 mM NaCl), cross-link was reversed and the DNA was purified and concentrated using the QIAquick PCR Purification kit (QIAGEN). Purified DNA was analyzed by conventional and real-time PCR with primers designed to amplify the

human A2M gene from -183 to -12; upper primer: 5'-AGGTGCTGTACGGTAAAAGTGAG-3'; lower primer: 5'-CCACCCACACAAGATCTCTAAAC-3'. Real-time PCR from two independent experiments was performed by triplicate with the Quantifast™ SYBR® Green PCR kit (QIAGEN). Quantifications were analyzed by the  $\Delta\Delta C_t$  method and corrected to account for 4% inputs (4).

### **Suppl. References**

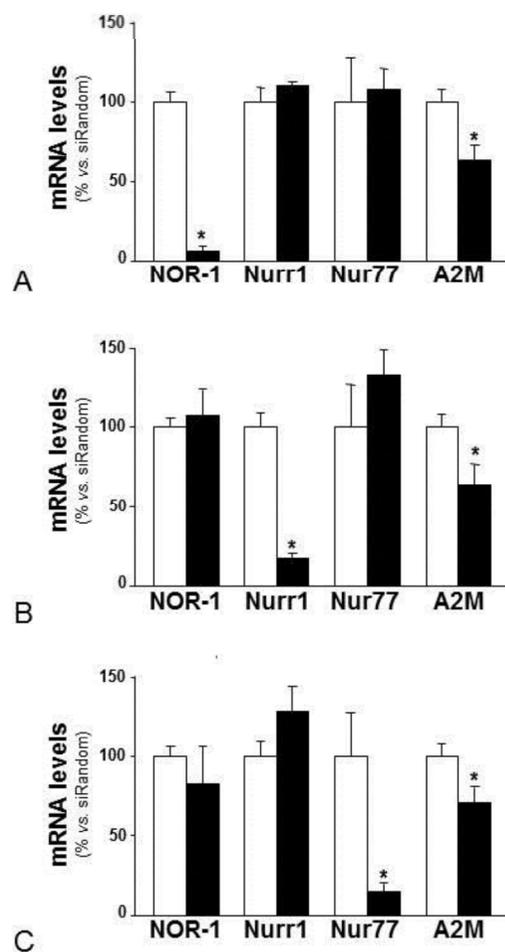
1. Nomiyama T, Nakamachi T, Gizard F, et al. The NR4A orphan nuclear receptor NOR1 is induced by platelet-derived growth factor and mediates vascular smooth muscle cell proliferation. *J Biol Chem* 2006; 281: 33467-33476.
2. Ohkura N, Ito M, Tsukada T, et al. Structure, mapping and expression of a human NOR-1 gene, the third member of the Nur77/NGFI-B family. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1308: 205-214.
3. Wingate AD, Campbell DG, Peggie M, et al. Nur77 is phosphorylated in cells by RSK in response to mitogenic stimulation. *Biochem J* 2006; 393: 715-724.
4. Calvayrac O, Rodríguez-Calvo R, Alonso J, et al. CCL20 is increased in hypercholesterolemic subjects and is upregulated by LDL in vascular smooth muscle cells: role of NF- $\kappa$ B. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011; 31: 2733-2741.
5. Castro DS, Hermanson E, Joseph B, et al. Induction of cell cycle arrest and morphological differentiation by Nurr1 and retinoids in dopamine MN9D cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 43277-43284.

## Supplemental Figure 1



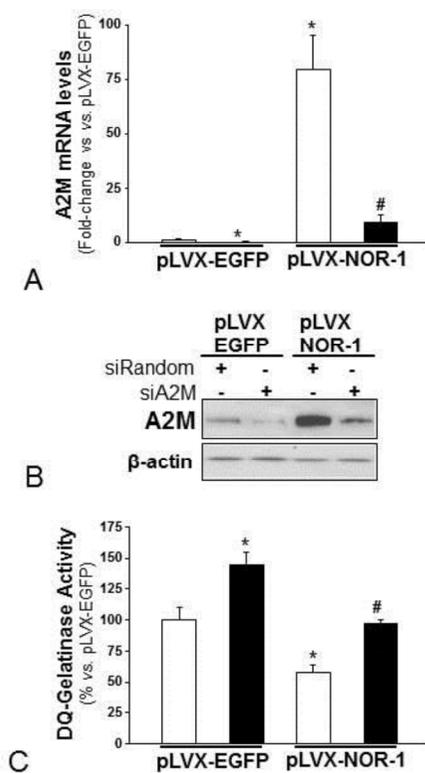
**Suppl. Figure 1.** Expression levels of NR4A receptors in control VSMC and in cells transduced to over-express NR4A receptors. VSMC were transduced with lentiviral pLVX vectors expressing each NR4A receptor (pLVX-NOR-1: NOR; pLVX-Nurr1: Nurr1; pLVX-Nur77: Nur77) or with pLVX-EGFP (GFP). The expression of each receptor was determined by real-time PCR (A) and Western blot (B) in non-transduced cells (NT) and in lentiviral transduced VSMC. Data are expressed as a mean  $\pm$  SD (n=6).  $p < 0.0001$ ; \*, vs. NT and pLVX-EGFP cells.

## Supplemental Figure 2



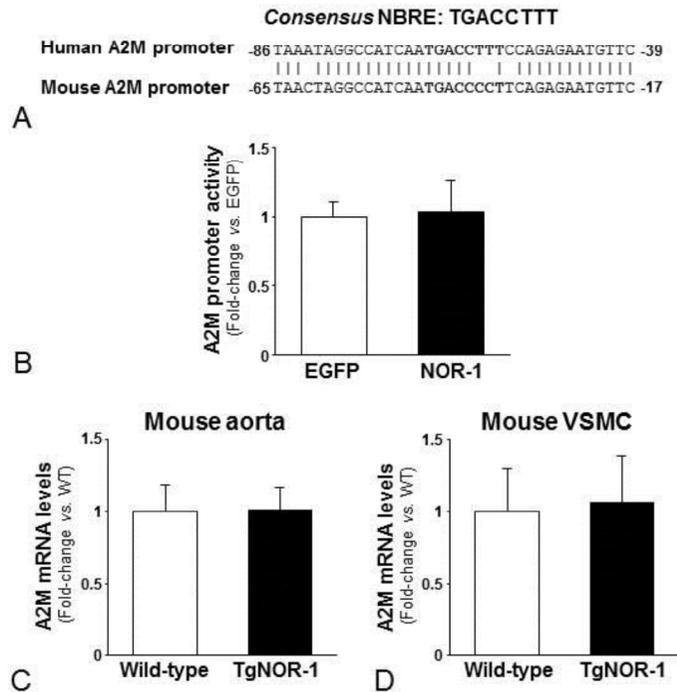
**Suppl. Figure 2.** NR4A knockdown attenuates basal alpha-2-macroglobulin (A2M) expression in human VSMC. VSMC were transfected with siRNAs against NOR-1 (A) Nurr1 (B), Nur77 (C) (black bars) or a scrambled sequence as a control (siRandom; white bars). Real-time PCR confirms the specific blockade of each NR4A receptor by the indicated siRNAs. As shown, A2M mRNA levels were significantly downregulated by the knockdown of any of these receptors. Data are expressed as a mean  $\pm$  SD (n=6).  $p < 0.05$ ; \*, vs. siRandom transfected cells.

### Supplemental Figure 3



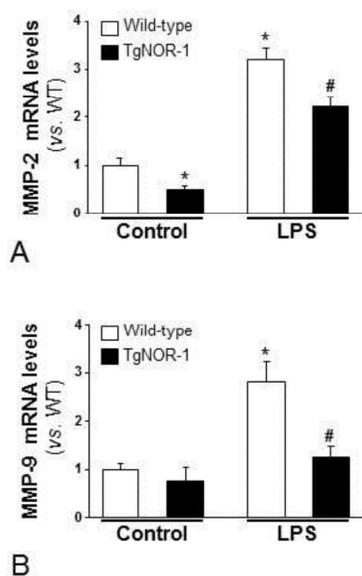
**Suppl. Figure 3.** Alpha-2-macroglobulin (A2M) knockdown attenuates the inhibition of MMP activity induced by NOR-1 over-expression. VSMC were transduced with pLVX-EGFP or pLVX-NOR-1 and transfected with an A2M specific siRNA (siA2M; black bars) or a scrambled sequence as a control (siRandom; white bars). Real-time PCR (A) and Western blot analysis (B) confirm the blockade of A2M mRNA and protein levels. (C) Gelatinolytic activity was assessed in cell supernatants using the DQ-gelatin assay. Data are expressed as a mean  $\pm$  SD (n=6). p<0.05: \*, vs. pLVX-EGFP cells transfected with the siRandom; p<0.05: #, vs. pLVX-NOR-1 transduced cells transfected with the siRandom.

## Supplemental Figure 4



**Suppl. Figure 4.** Alpha-2-macroglobulin (A2M) is not regulated by NR4A receptors in mouse. (A) Alignment of the proximal promoter regions corresponding to human and mouse A2M. As observed, the NBRE consensus binding site (upper panel) is not conserved in mouse A2M promoter. (B) Luciferase activity evaluated in NIH/3T3 cells co-transfected with a luciferase reporter vector (pGL3) containing the mouse A2M promoter (from -2089 to -86 relative to ATG) and pCMV5-expression vectors for EGFP (Control; white bar) and NOR-1 (black bar). Bars graph shows the inability of NOR-1 over-expression to modulate mouse A2M promoter (n=4). (C, D) A2M expression was not regulated by NOR-1 transgenesis in mice. A2M mRNA levels were analysed by real-time PCR in mouse aorta from wild-type (n=7) and transgenic mice that specifically over-express human NOR-1 in VSMC (TgNOR-1; n=9) (C), and in cultures of VSMC from these animals (n=5) (D). Data are expressed as mean  $\pm$  SD.

## Supplemental Figure 5



**Suppl. Figure 5.** NOR-1 attenuates the up-regulation of MMPs induced by pro-inflammatory stimuli in the vascular wall. MMP-2 (A) and MMP-9 (B) mRNA levels were analysed by real-time PCR in mouse aorta from wild-type mice (WT; n=14) and from transgenic animals that specifically over-express human NOR-1 in VSMC (TgNOR-1; n=14). Half of the animals of each group were treated with LPS (n=7) or saline (Control; n=7). As observed, over-expression of NOR-1 in VSMC ameliorated the LPS-induced increase in the expression of these MMPs. Data are expressed as mean $\pm$ SD. p<0.01: \*, vs. non-stimulated WT mice; #, vs. LPS-stimulated WT mice.

## 2. ANEXO II

Manuscrito en revisión titulado ***The nuclear receptor NOR-1 regulates the small muscle protein, X-linked (SMPX) and myotube differentiation,*** enviado a la revista *Scientific Reports*.



## **The nuclear receptor NOR-1 regulates the small muscle protein, X-linked (SMPX) and myotube differentiation**

Beatriz Ferrán<sup>1</sup>, Ingrid Martí-Pàmies<sup>1</sup>, Judith Alonso<sup>1</sup>, Ricardo Rodríguez-Calvo<sup>1</sup>, Silvia Aguiló<sup>1</sup>, Francisco Vidal<sup>2</sup>, Cristina Rodríguez<sup>1\*</sup> & José Martínez-González<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación Cardiovascular, CSIC-ICCC, IIB-Sant Pau, c/Sant Antoni Maria Claret 167, 08025 Barcelona, Spain. <sup>2</sup>Unitat de Diagnòstic i Teràpia Molecular, Banc de Sang i Teixits, Passeig Vall d'Hebron 119-129, Barcelona 08035, Spain.

\* The last two authors contributed equally to this work

**Running title:** SMPX is regulated by NOR-1 in muscle cells

Corresponding authors: José Martínez-González and Cristina Rodríguez, Centro de Investigación Cardiovascular (CSIC-ICCC), Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Avda. Sant Antoni Maria Claret 167. 08025 Barcelona. Spain. TEL: +34 935565896; FAX: +34 935565559; E-mail: [jmartinez@csic-iccc.org](mailto:jmartinez@csic-iccc.org); [crodriguez@csic-iccc.org](mailto:crodriguez@csic-iccc.org)

**Abstract**

Recent works have highlighted the role of NOR-1 in both smooth and skeletal muscle, and have proposed this nuclear receptor as a nexus that coordinates muscle performance and metabolic capacity. However, no muscle specific genes regulated by NOR-1 have been identified so far. To identify NOR-1 target genes, we over-expressed NOR-1 in human vascular smooth muscle cells (VSMC). These cells subjected to sustained over-expression of supraphysiological levels of NOR-1 experienced marked phenotypic changes and up-regulated the skeletal muscle protein X-linked (SMPX), a protein typically expressed in striated muscle and associated to cell shape. By transcriptional studies and DNA-protein binding assays, we identified a non-consensus NBRE site in human SMPX promoter, critical for NOR-1 responsiveness. The expression of SMPX was higher in human skeletal muscle myoblasts (HSMM) than in human VSMC, and further increased in HSMM differentiated to myotubes. NOR-1 silencing prevented SMPX expression in HSMM, as well as their differentiation to myotubes, but the up-regulation of SMPX was dispensable for HSMM differentiation. Our results indicate that NOR-1 regulate SMPX in human muscle cells and acts as a muscle regulatory factor, but further studies are required to unravel its role in muscle differentiation and hypertrophy.

## Introduction

Neuron-derived orphan receptor-1 (NOR-1) is a transcription factor belonging to the Nuclear Receptor subfamily 4 group A (NR4A). NOR-1 was firstly identified in forebrain neural cells undergoing apoptosis<sup>1</sup>; however, results from different cell types support a role for this nuclear receptor in an array of tissues, modulating diverse and sometimes antithetical processes such as cell survival and apoptosis, and cell proliferation and differentiation<sup>2,3,4,5</sup>. NOR-1 participates in vascular biology, inflammation, immunity, and in lipid and glucose metabolism<sup>6,7,8,9,10</sup>. In fact, NOR-1 misregulation has been associated with a variety of high-incidence human pathologies including cardiovascular disease, diabetes, obesity and cancer<sup>3,6,7,8,11</sup>.

Structural studies have shown that NOR-1, as well as the other two members of the NR4A family (Nur77 and Nurr1), lacks an accessible ligand-binding pocket<sup>12,13</sup>. These receptors seem to be constitutively active and their transcriptional activities are mainly dependent on their expression levels. NOR-1 is expressed at low levels in vascular tissues and resting vascular cells, but it is quickly induced by growth factors and cytokines, acting as an immediate-early response gene involved in vascular hyperplasia<sup>4,14,15,16,17,18,19</sup>. NOR-1 is also expressed in the heart and skeletal muscle (at high levels compared with other organs)<sup>4,20,21,22</sup>, and in these tissues NOR-1 up-regulation has been associated with hypertrophy<sup>23,24</sup>. Therefore, both the basal expression of NOR-1 and the pathophysiological consequences of NOR-1 over-activation seem to be tissue-dependent. Gain- and loss-of-function studies have allowed to identify a few NOR-1 target genes involved in vascular cell proliferation (e.g. cyclin D1 and S phase kinase-associated protein 2 [SKP2])<sup>17,25</sup>, and have associated this receptor with the expression of genes involved in specific aspects of lipid, carbohydrate and energy homeostasis in striated muscle<sup>23,26,27</sup>. However, today a limited number of NOR-1 target genes have been reported. In the present study, we over-expressed this NR4A receptor in human vascular smooth muscle cells (VSMC) by lentiviral transduction to identify new NOR-1 target genes. VSMC subjected to sustained over-expression of supraphysiological levels of NOR-1 experienced

marked phenotypic changes and up-regulated a gene typically expressed in striated muscle (skeletal muscle protein X-linked, SMPX). We characterized the regulation of SMPX by NOR-1 and uncovered the critical role of this nuclear receptor in the differentiation of human skeletal myoblasts to myotubes, a process which also entails the up-regulation of SMPX.

## Results

**NOR-1 over-expression in VSMC modifies cell shape and increases SMPX expression.** Human VSMC were transduced to over-express NOR-1 (Supplementary Fig. S1). VSMC over-expressing NOR-1 exhibited striking differences in cell morphology compared to control cells (Fig. 1a). This phenotypic switch in cells expressing high and sustained levels of NOR-1 was associated to a low proliferation rate (Supplementary Fig. S2a) and signs of cell hypertrophy such as increased total cellular protein and enhanced cellular surface area (Supplementary Fig. S2b and c). As a first approach to identify genes regulated by NOR-1, we analyzed the mRNA levels of several genes related to cell shape/morphology encoding for cytoskeleton and cytoskeletal-associated proteins. The over-expression of NOR-1 did not alter the expression of most of these genes, but slightly induced the expression levels of the transcript corresponding to the ubiquitously expressed form of caldesmon (I-CaD;  $\approx$  1.9-fold). The most striking results, however, was the strong up-regulation of SMPX (a stretch-responsive skeletal muscle protein) (Fig. 1b). SMPX was up-regulated up to 170-fold as compared with control cells (transduced with pLVX or pLVX/EGFP) (Fig. 1c). The regulation of both SMPX and I-CaD was confirmed by Western blot (Fig. 1d). SMPX expression was detected at low levels in human vascular tissues (aorta and coronary arteries) compared to its expression in skeletal muscle (Supplementary Fig. S3).

**NOR-1 induces SMPX promoter activity.** While no NOR-1 response elements were detected in the promoter of the caldesmon encoding gene (CALD1), *in silico* analysis revealed the presence of four

putative NBRE binding sites in the SMPX promoter (positions -796, -617, -509 and -167 from the transcription start site), although none of them was fully conserved (Fig. 2a). To analyze the functionality of these elements, a promoter fragment (-2260 to +64) was cloned into the luciferase reporter plasmid pGL3. In co-transfection assays, the pCMV5/NOR-1 expression vector significantly induced SMPX transcriptional activity (Fig. 2b). The contribution of each putative NBRE to the NOR-1-dependent SMPX regulation was established by promoter deletion and site-directed mutagenesis. As shown in figure 2b, the deletion of a fragment containing the three distal putative NBRE sites did not affect the up-regulation of SMPX promoter elicited by NOR-1. The deletion of the proximal NBRE(-167/-160) site or its mutagenesis abrogated the NOR-1-mediated induction of SMPX transcriptional activity, suggesting that this site confers NOR-1-responsiveness. In contrast to human SMPX, mouse SMPX seems to be unresponsive to NOR-1, as far as no NOR-1 response elements could be detected in mouse SMPX promoter and neither regulation of SMPX by NOR-1 in mouse aorta nor in mouse VSMC was observed (Supplementary Fig. S4).

**NOR-1 binds to SMPX promoter through a non-consensus NBRE site.** To further characterize the functionality of the putative NBRE(-167/-160) site, we performed electrophoretic mobility shift assays (EMSA) using nuclear extracts from VSMC over-expressing a FLAG-tagged NOR-1. As shown in Fig. 2c, a differential pattern of retarded bands was observed in EMSA using this NBRE site as a probe and nuclear extracts from NOR-1-transduced cells, respect those from control cells (transduced with pLVX/EGFP). NOR-1 over-expression increased the intensity of two of these complexes, that were competed by an excess of unlabeled probe, and one of them (complex I) was supershifted by an anti-FLAG antibody. Conversely, mutation of the NBRE probe abrogated both the enhanced binding found in NOR-1-transduced cells and the supershift. Taken together, these data demonstrate that NOR-1 specifically bind to this NBRE site. To confirm that NOR-1 actually binds to the SMPX promoter *in vivo*, chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays were performed in VSMC

over-expressing FLAG-tagged NOR-1. Proteins directly bound to chromatin were immunoprecipitated using an antibody against the FLAG sequence or an unspecific IgG. Conventional and real-time PCR were used to amplify a genomic region surrounding the NBRE(-167/-160) site in SMPX promoter. Consistent with data from EMSA, ChIP assays demonstrated that NOR-1 specifically binds to the SMPX promoter region encompassing the NBRE site (Fig. 2d). A control IgG did not precipitate detectable DNA and pre-immunoprecipitation samples evidenced equivalent DNA input.

**NOR-1 knockdown decreased SMPX mRNA and protein levels in human skeletal muscle myoblasts (HSMM).** To evaluate the impact of NOR-1 knockdown on SMPX expression, a siRNA was used to silence NOR-1; however, the low expression levels of SMPX in primary VSMC cultures preclude this approach. Since SMPX was early identified as a gene preferentially expressed in striated muscle, we analyzed the expression level of SMPX in HSMM cultures. The expression of SMPX was about 800-fold higher in these cells than in primary human VSMC cultures, and further increased in HSMM differentiated to myotubes (Supplementary Fig. S5). NOR-1 silencing, that was more efficient in non-differentiated (Fig. 3a) than in differentiated cells (Fig. 3b), was associated with a concomitant reduction of SMPX expression, as determined by real-time PCR and Western blot. The differentiation (in 2% horse serum during five days) transformed HSMM with typical myoblast morphology to elongated and multinuclear myotubes (Fig. 4a). HSMM differentiation increased NOR-1 and SMPX mRNA ( $\approx$  2.4-fold and  $\approx$  3.5-fold, respectively) and protein levels, as determined by Western blot and immunocytochemistry (Fig. 4b-d).

**The effects of NOR-1 on SMPX and HSMM differentiation are independent events.** NOR-1 silencing prevented the phenotypic changes as well as the up-regulation of SMPX (both mRNA and protein levels) associated to HSMM differentiation (Fig. 5). Interestingly, NOR-1 knockdown also prevented the up-regulation of cell differentiation markers such as MyHC and p27 (Fig. 5c and d). In ChIP

assays, HSMM differentiation significantly increased the capacity of NOR-1 to bind to the NBRE(-167/-160) site in SMPX promoter, while this increase was abolished in cells previously transfected with a siRNA against NOR-1 (Fig. 6). SMPX silencing did not affect HSMM differentiation (Fig. 7). Thus, the NOR-1 mediated increase of SMPX expression associated to HSMM differentiation seems to be dispensable for cell differentiation.

## Discussion

NOR-1 exhibits a dissimilar expression pattern in different tissues<sup>4,20,21,22</sup> and has been shown to regulate diverse and sometimes antithetical processes such as cell survival and apoptosis, and cell proliferation and differentiation<sup>2,3,4,5</sup>. Interestingly, the transient up-regulation of this immediate-early gene by cytokines and growth factors has been associated with VSMC proliferation and migration<sup>4,14,15,16,17,18</sup>, but in skeletal muscle, NOR-1 is induced by muscle contractile activity<sup>28,29,30</sup> and has been related with muscle hypertrophy<sup>23,24</sup>. Since the role of NOR-1 in lipid and glucose metabolism was established, it has been proposed as a nexus that coordinates muscle performance and metabolic capacity<sup>26,27</sup>. Few NOR-1 target genes, however, have been described so far and none specifically related to the muscular tissue. Here we show that SMPX, a gene commonly expressed in striated muscle and identified as a stretch-responsive gene upregulated in skeletal muscle hypertrophy<sup>31</sup>, is a target of NOR-1. Further we assess the role of NOR-1 and SMPX in the differentiation of human myoblasts.

We used lentiviral vectors for stable ectopic expression of NOR-1 in human VSMC. The sustained over-expression of this early gene induced phenotypic changes in VSMC. Morphological and cell phenotypic changes are commonly accompanied by profound alterations in gene expression pattern affecting cytoskeleton and cytoskeletal-associated proteins. Since NOR-1 is a transcription factor and therefore modulates gene expression, as a first approach we analyzed mRNA levels of a set of genes previously associated with changes in cell morphology. Despite the observed

reorganization of the actin filaments, neither the expression of  $\beta$ -actin nor that of smooth muscle specific  $\alpha$ -SMA encoding genes experienced noticeable changes. Similarly, expression levels of several cytoskeletal associated proteins remained unchanged or experienced minor changes. By far the most striking result was the strong increase of SMPX, a gene typically expressed in both heart and skeletal muscle<sup>32</sup>.

SMPX (also called Chisel, Csl) is a small proline-rich protein (9 kDa) highly conserved among mammalian species<sup>32</sup>, that was firstly identified by reciprocal probing as a muscular protein selectively expressed in human cardiac and skeletal muscle cells<sup>33</sup>. By suppressive subtractive hybridization strategy, SMPX was later identified as a transcriptional target of the cardiac homeodomain factor Nkx2-5 in a mouse line carrying a null allele of Nkx2-5<sup>32</sup>, and as a stretch-responsive gene in mouse skeletal muscle<sup>31</sup>. Low SMPX expression, however, has also been detected in smooth muscle-rich tissues such as stomach<sup>34</sup>, intestine<sup>32,34</sup> and pulmonary veins<sup>32</sup>. In embryos, SMPX is expressed in sub-regions of the developing heart corresponding to the future chamber myocardium and in developing skeletal muscles<sup>35</sup>. In fact, in the heart, SMPX is considered a chamber-specific gene, activated as part of a chamber myocardium-specific program of gene expression, which also includes Natriuretic precursor peptide type A (Nppa), Connexin (Cx) 40 and Cx43<sup>32,36</sup>. Interestingly, the formation of specialized heart structures such as the sinoatrial node (SAN) requires the local repression of these “chamber-specific” genes (including SMPX)<sup>36,37,38</sup>. Surprisingly, SMPX knockout mice showed no obvious phenotype; however, SMPX over-expression in the C2C12 myogenic cell line affect cytoskeletal dynamics and cell shape, and promote cell signaling-dependent myocyte fusion<sup>32,35</sup>. These results suggest that SMPX could play a role in the regulatory network through which muscle cells coordinate their structural and functional states during growth, adaptation, and repair<sup>32</sup>. However, the precise role played by SMPX in the musculature is presently unknown. Mutations affecting SMPX have been associated to x-chromosome linked hearing loss in humans<sup>39,40</sup>, but there is no information regarding SMPX in

cardiovascular or muscular human disorders. Therefore, further studies are needed to understand the pathophysiological role of SMPX in human diseases.

As we mentioned above, SMPX is expressed in muscle tissues, predominantly in striated muscle and, in a lesser extent, in several smooth muscle tissues<sup>31,33,34</sup>. We confirmed this expression pattern using a panel of mouse tissues (Supplementary Fig. S6). In accordance with this expression pattern, previous studies of SMPX promoter identified putative *cis* regulatory elements for muscle-specific factors such as myocyte-specific enhancer factor (MEF2)<sup>31</sup>, a transcription factor involved in myogenesis<sup>41</sup>, MyoD<sup>31</sup>, a factor that triggers cell differentiation into myotubes, and Nkx-2.5<sup>31</sup>, a cardiac homeodomain transcription factor involved in cardiac development<sup>42</sup>. We also show for the first time that SMPX is expressed in the human vasculature (aorta and coronary arteries). Our *in silico* analysis revealed the presence of several putative NBRE sites potentially involved in the up-regulation of SMPX by NOR-1. We experimentally analyzed the functionality of these elements. Serial promoter deletion and site-directed mutagenesis analysis identified the proximal NBRE(-167/-160) site as crucial for the NOR-1-mediated induction of SMPX promoter activity. Accordingly, the direct binding of NOR-1 to this site was demonstrated *in vitro* and *in vivo* by EMSA and CHIP assays, respectively. Our results involving NOR-1 in the regulation of SMPX expand the knowledge on the SMPX promoter structure and regulation. The regulation of SMPX by NOR-1 was further confirmed in human skeletal muscle cells. SMPX mRNA levels were high in HSMM, and in the course of the differentiation to myotubes both NOR-1 and SMPX were up-regulated. NOR-1 silencing significantly reduced SMPX expression in both differentiated and non-differentiated HSMM. Interestingly, the differentiation process was dependent on NOR-1 but independent of SMPX. Although in certain contexts NR4A receptors (particularly NOR-1 and Nur77) can be totally or partially redundant<sup>43,44</sup>, which would hinder the observation of phenotypic consequences of deleting a single NR4A receptor, it should be emphasized that the specific silencing of NOR-1 prevented HSMM differentiation.

Further studies are needed, however, to unravel the role of NOR-1 in the process of HSMM differentiation.

In summary, our data show that long lasting over-expression of NOR-1 in VSMC led to a non-proliferative, hypertrophic phenotype and to the induction of a protein commonly expressed in striated muscle whose expression further increases in skeletal muscle hypertrophy. Although the role of NOR-1 in hypertrophy remains to be elucidated, these results are coherent with the negative regulation of myostatin (anti-hypertrophic protein)<sup>45</sup> by NOR-1 in the mouse skeletal muscle cell line C2C12<sup>23</sup> and in the muscle of Nur77-transgenic mice<sup>44</sup>. It should be noted, however, that our *in silico* analysis identify the NBRE responsive for NOR-1 regulation in different mammalian species but not in murine rodents, and our experimental results discard SMPX as a NOR-1 target gene in mouse. Thus, unfortunately further testing on the functional significance of SMPX modulation by NOR-1 by using small animal models is not possible. Previous studies from us and others indicate that there are notable differences between human and murine rodents in both the mechanisms that regulate NOR-1<sup>46</sup> and NOR-1 target genes<sup>47</sup>. Consequently, before extrapolate biomedical consequences from NOR-1 biology in mouse models, it is mandatory to corroborate the data in humans. Therefore, NOR-1 seems to complement other muscle regulatory factors in the regulation of proteins and processes in the musculature<sup>26</sup>, although further studies are required to establish the relevance of this nuclear receptor in the skeletal muscle biology in humans.

## **Materials and methods**

**Human tissue sampling and preservation.** The study was approved by the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (HSCSP) Ethics Committee and was conducted according to the Declaration of Helsinki. Written informed consent was obtained from each patient. Coronary arteries and aorta were collected from patients undergoing heart transplant and coronary artery at the HSCSP, and skeletal muscle samples were obtained from patients undergoing lower limb amputation at the same

hospital. Specimens were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until the preparation of protein and RNA extracts.

**Cell cultures.** VSMC were obtained from human non-atherosclerotic arteries of hearts removed in transplant surgeries at the HSCSP by a modification of the explants technique<sup>48</sup>. All the procedures were approved by the Reviewer Institutional Committee on Human Research of the HSCSP and conform to the Declaration of Helsinki. Written informed consent was obtained from each patient. VSMC were cultured as described<sup>14</sup>. HSMM (Lonza) were cultured following the supplier's recommendations. For HSMM differentiation, cells were cultured during five days in DMEM/F-12 supplemented with 2% horse serum, 2.5 mM L-glutamine, 15 mM HEPES, and 1 mM sodium pyruvate. The HEK293T and HeLa cell lines were cultured in DMEM supplemented with 10% FCS, 2 mM L-glutamine and antibiotics.

**Generation of lentiviral particles and transduction.** The human NOR-1 cDNA was obtained from a pBlueScript-NOR1 construct, kindly provided by Dr. N. Ohkura (National Cancer Center Research Institute, Tokyo, Japan)<sup>20</sup>, and the mouse NOR-1 cDNA linked to a FLAG sequence was obtained from the plasmid pCMV5/NOR-1-FLAG, kindly provided by Dr. J. Hastie (University of Dundee, Scotland)<sup>49</sup>. The pLVX/NOR-1, pLVX/NOR-1-FLAG and pLVX/EGFP were obtained as described<sup>10</sup>. These constructs and the empty pLVX-Puro vector (pLVX) were transfected in HEK293T cells according to Lenti-X™ Lentiviral Expression System Kit (Clontech). After 48 h, supernatants containing viral particles were harvested and titrated. Lentiviral transductions of VSMC were performed for 48 h at a multiplicity of infection of 15 in presence of polybrene (8 µg/mL), and transduced cell populations were enriched by puromycin selection (1.2 µg/mL). pLVX and pLVX/EGFP vectors were used as controls obtaining similar results.

**Analysis of cell proliferation and hypertrophy.** The proliferation rate of lentiviral transduced and non-transduced VSMC was determined by cell counting. Cells were harvested by trypsinization, resuspended in growth medium and cell number was determined by using a Neubauer chamber. Data are expressed as the ratio of cell number/initial cell number. To determine total cell protein, trypsinized cells were washed with PBS, resuspended in lysis buffer (10 mM Tris/HCl pH 7.4, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 0.5% SDS) and protein concentration was determined by the BCA Protein Assay™ (Pierce). The ratio of total protein/cell number was referred to that of non-transduced cells. Cell surface area was determined in subconfluent cell monolayers. Images were taken from five random fields and cell surface area was measured by using ImageJ 1.49 software (National Institute Health, USA). Data (arbitrary units) are expressed relative to those of non-transduced cells.

**Transfections with small interfering RNA (siRNA).** Silencer Select Pre-designed siRNA (Ambion) were used for NOR-1 (s15541) and SMPX (s22597) knockdown. The Silencer Select Negative Control #1 was used as a control. Briefly, one day before transfection, HSMM were seeded in complete growth medium. Then, the medium was replaced with antibiotic-free medium and cells were transfected for 8 hours with 20 nM siRNA, using 7.5  $\mu\text{L}$  of Lipofectamine RNAiMAX Reagent (Invitrogen). After transfection, the medium was replaced with fresh antibiotic-free medium and cells were incubated for 48 h. Transfections of differentiated HSMM were performed in the same conditions, but cells were previously cultured in differentiation medium during five days and, after transfection, medium was replaced by fresh differentiation medium.

**Gene expression: real-time PCR.** Total RNA was extracted from cell cultures using TRIsure™ (Bioline) according to the manufacturers' protocols. Total RNA (1  $\mu\text{g}$ ) was reverse-transcribed with the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Levels of mRNA were assessed by

real-time PCR using TaqMan<sup>TM</sup> gene expression assays-on-demand (Applied Biosystems). TATA-binding protein (TBP) were used as endogenous controls<sup>19</sup>.

**SMPX promoter constructions and mutagenesis.** A 2324 bp DNA fragment of the human SMPX promoter (nucleotides -2260 to +64 relative to the transcription start site) was generated by PCR and cloned into pGL3 vector (pGL3/SMPX-2260). The primers used were: 5'-TTATAGCTAGCCAGGAGTGC GG TATTGA-3' (forward; *NheI* site is underlined) and 5'-TGAGCTGAGATCTCAATCCGATGCT-3' (reverse; *BglII* site is underlined). Promoter deletion constructs were generated by internal digestion with *KpnI* (pGL3/SMPX-354) or by PCR using the reverse primer indicated above and the following forward primer: 5'-GCTTTGAGCTCGGTCAAGCCTTTCGGA-3' (pGL3/SMPX-143; *SacI* site is underlined). The NBRE(-167/-160) site present in SMPX promoter was mutated using the QuikChange<sup>TM</sup> II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) according to the manufacturer's instructions. The primers used were: forward 5'-AGCCACCTCCCGCTGctATTGAGCCTGCTTTC-3', and reverse 5'-GAAAGCAGGCTCAAAtagCAGCCGGGAGGTGGCT-3' (NBRE site is underlined and changes are indicated in lower case letters). *In silico* analysis of the mutated sequence confirm that no new response elements were introduced. Wild-type and mutated sequences were confirmed by DNA sequencing.

**Transient transfection and luciferase assays.** Subconfluent VSMC were transfected using Lipofectamine LTX<sup>TM</sup> and Plus Reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. SMPX constructs were co-transfected together with pCMV5/NOR-1 expression plasmid or the corresponding empty vector (pCMV5). Briefly, transient transfections were performed in 12 well-plates using 1.25  $\mu$ L/well of Lipofectamine, 0.5  $\mu$ L/well of Plus Reagent, 0.5  $\mu$ g/well of SMPX construct, 0.05  $\mu$ g/well of expression plasmid, and 0.05  $\mu$ g/well of pRL-SV40 as an internal control.

The DNA/liposome complexes were added to the cells for 16 h and then, cells were washed once and maintained in growth medium without antibiotics for 24 h. Luciferase activity was determined in cell lysates using the Dual-Luciferase™ Reporter Assay System (Promega) according to the manufacturer's protocol. Results were expressed as the ratio of firefly to renilla activity.

**Western blot analysis.** Cellular extracts were obtained using a lysis buffer containing 10 mM Tris/HCl pH 7.4, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> and 0.5% SDS. Protein extracts from human tissues were generated using an ice-cold lysis buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1% (w/v) Triton X-100, 150 mM NaCl and 1 mM DTT, supplemented with phosphatase and protease inhibitors. The protein concentration was determined by the BCA Protein Assay™. Lysates were resolved by SDS-PAGE under reducing conditions and electrotransferred onto Immobilon polyvinylidene difluoride membranes. The membranes were probed using antibodies against FLAG epitope (F1804, Sigma-Aldrich), NOR-1 (sc-22519, Santa Cruz Biotechnology), SMPX (AV41597-100UG, Sigma-Aldrich), I-Cad (ab32330, Abcam), MYH10 (ab684, Abcam), MyHC (sc-20641, Santa Cruz Biotechnology), p27 (610242, BD Transduction Laboratories), and β-actin (A5441, Sigma-Aldrich), followed by appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies and a chemiluminiscent detection system. Equal loading of protein in each lane was verified by Ponceau staining and by β-actin levels.

**EMSA.** Nuclear extracts were obtained from human VSMC by a modified Dignam method<sup>19</sup>. EMSA was performed as described using 5 µg of nuclear extracts<sup>50</sup>. Double-stranded DNA probes containing the putative wild-type NBRE(-167/-160) site in SMPX promoter (5'-CTCCCGGCTGACATTGAGCCTGCTTTC-3') and its mutated form (5'-CTCCCGGCTGctATTGAGCCTGCTTTC-3') were used (changes are indicated in lower case letters). DNA probes were labelled with [γ-<sup>32</sup>P]-ATP using T4 polynucleotide kinase and purified on a Sephadex G-50 column. In competition assays, the unlabeled probe was added before the labeled

one and was incubated for 10 min on ice. For supershift assays, nuclear extracts were preincubated for 25 min with 2 µg of an anti-FLAG antibody (F1804) before adding the radiolabeled probe. Protein-DNA complexes were resolved by electrophoresis at 4 °C on 5% polyacrylamide gels in 0.5X TBE. Gels were dried and subjected to autoradiography using a Storage Phosphor Screen (GE Healthcare). Shifted bands were detected using a Typhoon 9400 Scanner (GE Healthcare).

**ChIP assay.** VSMC or HSMM were cross-linked with 1% formaldehyde for 10 min. The cross-link reaction was stopped by adding glycine (100 mM). Then, cells were extensively washed and lysed in lysis buffer (LB) 1 (50 mM HEPES-KOH, pH 7.5, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% NP-40, 0.3% Triton X-100, 10% glycerol), supplemented with protease inhibitors. After washing, nuclei were collected and resuspended in LB2 (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 0.1% Na-Deoxycholate, 0.5% N-lauroylsarcosine). Chromatin was sheared by sonication and an aliquot was saved and stored as input DNA. Supernatants were then immunoprecipitated with 5 µg of anti-FLAG antibody (F1804; for transduced VSMC), NOR-1 (sc-22519; for HSMM) or an IgG as a control. Immune complexes were recovered by addition of A/G-Agarose beads. After washing, complexes were extracted, cross-link was reversed and the DNA was purified and concentrated. Purified DNA was analyzed by conventional and real-time PCR with primers designed to amplify a 167 bp DNA fragment (forward primer: 5'-CGAACTTGCTATACCCACTCA-3'; reverse primer: 5'-GTTTGATACAAGCCATACGCTG-3'). Real-time PCR from two independent experiments was performed by triplicate with the Quantifast™ SYBR™ Green PCR Kit (QIAGEN). Quantifications were analyzed by the  $\Delta\Delta C_t$  method and corrected to account for 4% inputs<sup>51</sup>.

**Immunocytochemistry.** Cells were fixed in ice-cold 4% paraformaldehyde. After blocking, cells were incubated with anti-FLAG (F1804), anti-NOR-1 (H00008013-M06, Abnova), anti-SMPX (PA3-070, Pierce) or anti-MyHC (sc-20641) antibodies in PBS containing 5% BSA, overnight at 4 °C. Alexa Fluor

488 goat anti-rabbit and Alexa Fluor 488 goat anti-mouse immunoglobulins (Molecular Probes) were used as secondary antibodies. For nuclei and F-actin detections, Hoechst 33342 trihydrochloride trihydrate (H3570, Invitrogen) and Alexa Fluor phalloidin (A22284 (red), A12379 (green), Invitrogen), respectively were used. Controls without the primary antibody were included in all procedures. After extensive washing, cells were mounted with ProLong™ Mounting Medium (Molecular Probes) and analyzed by confocal microscopy.

**Statistical analysis.** Data are expressed as mean  $\pm$  s.d. (unless otherwise state). Significant differences were established by Student's t-test or one-way ANOVA, according to the number of groups compared, using the GraphPad InStat program (GraphPad Software V2.03) (GraphPad Software Inc.). Differences were considered significant at  $P < 0.05$ .

## References

1. Ohkura, N., Hijikuro, M., Yamamoto, A. & Miki, K. Molecular cloning of a novel thyroid/steroid receptor superfamily gene from cultured rat neural cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **205**, 1959-1965 (1994).
2. Martorell, L. *et al.* The hypoxia-inducible factor 1/NOR-1 axis regulates the survival response of endothelial cells to hypoxia. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 5828-5842 (2009).
3. Mullican, S. E. *et al.* Abrogation of nuclear receptors Nr4a3 and Nr4a1 leads to development of acute myeloid leukemia. *Nat. Med.* **13**, 730-735 (2007).
4. Martínez-González, J., Rius, J., Castello, A., Cases-Langhoff, C. & Badimon, L. Neuron-derived orphan receptor-1 (NOR-1) modulates vascular smooth muscle cell proliferation. *Circ. Res.* **92**, 96-103 (2003).
5. Castro, D.S. *et al.* Induction of cell cycle arrest and morphological differentiation by Nurr1 and retinoids in dopamine MN9D cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 43277-43284 (2001).

6. Martínez-González, J. & Badimon, L. The NR4A subfamily of nuclear receptors: new early genes regulated by growth factors in vascular cells. *Cardiovasc. Res.* **65**, 609-618 (2005).
7. Pei, L. *et al.* NR4A orphan nuclear receptors are transcriptional regulators of hepatic glucose metabolism. *Nat. Med.* **12**, 1048-1055 (2006).
8. Zhao, Y. & Bruemmer, D. NR4A orphan nuclear receptors: transcriptional regulators of gene expression in metabolism and vascular biology. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30**, 1535-1541 (2010).
9. Sekiya, T. *et al.* Nr4a receptors are essential for thymic regulatory T cell development and immune homeostasis. *Nat Immunol.* **14**, 230-237(2013).
10. Calvayrac, O. *et al.* NOR-1 modulates the inflammatory response of vascular smooth muscle cells by preventing NFκB activation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **80**, 34-44 (2015).
11. Mohan, H. M. *et al.* Molecular pathways: the role of NR4A orphan nuclear receptors in cancer. *Clin. Cancer Res.* **18**, 3223-3228 (2012).
12. Wang, Z. *et al.* Structure and function of Nurr1 identifies a class of ligand-independent nuclear receptors. *Nature* **423**, 555-560 (2003).
13. Baker, K. D. *et al.* The Drosophila orphan nuclear receptor DHR38 mediates an atypical ecdysteroid signaling pathway. *Cell* **731**, 731-742 (2003).
14. Rius, J., Martínez-González, J., Crespo, J. & Badimon, L. Involvement of neuron-derived orphan receptor-1 (NOR-1) in LDL-induced mitogenic stimulus in vascular smooth muscle cells: role of CREB. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 697-702 (2004).
15. Crespo, J., Martínez-González, J., Rius, J. & Badimon, L. Simvastatin inhibits NOR-1 expression induced by hyperlipemia by interfering with CREB activation. *Cardiovasc. Res.* **67**, 333-341 (2005).
16. Rius, J., Martínez-González, J., Crespo, J. & Badimon, L. NOR-1 is involved in VEGF-induced endothelial cell growth. *Atherosclerosis* **184**, 276-282 (2006).

17. Nomiya, T. *et al.* The NR4A orphan nuclear receptor NOR1 is induced by platelet-derived growth factor and mediates vascular smooth muscle cell proliferation. *J. Biol. Chem.* **281**, 33467-33476 (2006).
18. Martorell, L., Martínez-González, J., Crespo, J., Calvayrac, O. & Badimon, L. Neuron-derived orphan receptor-1 (NOR-1) is induced by thrombin and mediates vascular endothelial cell growth. *J. Thromb. Haemost.* **5**, 1766-1773 (2007).
19. Rodríguez-Calvo, R. *et al.* Over-expression of neuron-derived orphan receptor-1 (NOR-1) exacerbates neointimal hyperplasia after vascular injury. *Hum. Mol. Genet.* **22**, 1949-1959 (2013).
20. Ohkura, N. *et al.* Structure, mapping and expression of a human NOR-1 gene, the third member of the Nur77/NGFI-B family. *Biochim. Biophys. Acta* **1308**, 205-214 (1996).
21. Ohkura, N. *et al.* Alternative splicing generates isoforms of human neuron-derived orphan receptor-1 (NOR-1) mRNA. *Gene* **211**, 79-85 (1998).
22. Myers, S. A., Eriksson, N., Burow, R., Wang, S. C. & Muscat, G. E. Beta-adrenergic signaling regulates NR4A nuclear receptor and metabolic gene expression in multiple tissues. *Mol. Cell. Endocrinol.* **309**, 101-108 (2009).
23. Pearen, M. A. *et al.* The orphan nuclear receptor, NOR-1, is a target of beta-adrenergic signaling in skeletal muscle. *Endocrinology* **147**, 5217-5227 (2006).
24. Feng, X. J. *et al.* The orphan receptor NOR1 participates in isoprenaline-induced cardiac hypertrophy by regulating PARP-1. *Br. J. Pharmacol.* **172**, 2852-2863 (2015).
25. Gizard, F. *et al.* Transcriptional regulation of S phase kinase-associated protein 2 by NR4A orphan nuclear receptor NOR1 in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **286**, 35485-35493 (2011).
26. Pearen, M. A. *et al.* The nuclear receptor, Nor-1, markedly increases type II oxidative muscle fibers and resistance to fatigue. *Mol. Endocrinol.* **26**, 372-384 (2012).

27. Pearen, M. A. *et al.* Transgenic muscle-specific Nor-1 expression regulates multiple pathways that effect adiposity, metabolism, and endurance. *Mol. Endocrinol.* **27**, 1897-1917 (2013).
28. Mahoney, D. J., Parise, G., Melov, S., Safdar, A. & Tarnopolsky, M. A. Analysis of global mRNA expression in human skeletal muscle during recovery from endurance exercise. *FASEB J.* **19**, 1498-1500 (2005).
29. Kawasaki, E. *et al.* Role of local muscle contractile activity in the exercise-induced increase in NR4A receptor mRNA expression. *J. Appl. Physiol.* **106**, 1826-1831 (1985).
30. Petrie, M. A., Suneja, M., Faidley, E. & Shields, R. K. A minimal dose of electrically induced muscle activity regulates distinct gene signaling pathways in humans with spinal cord injury. *PLoS One* **9**, e115791 (2014).
31. Kemp, T. J. *et al.* Identification of a novel stretch-responsive skeletal muscle gene (Smpx). *Genomics* **72**, 260-271 (2001).
32. Palmer, S. *et al.* The small muscle-specific protein Csl modifies cell shape and promotes myocyte fusion in an insulin-like growth factor 1-dependent manner. *J. Cell Biol.* **153**, 985-998 (2001).
33. Patzak, D., Zhuchenko, O., Lee, C. C. & Wehnert, M. Identification, mapping, and genomic structure of a novel X-chromosomal human gene (SMPX) encoding a small muscular protein. *Hum. Genet.* **105**, 506-512 (1999).
34. Ren, Z. Q., Xiong, Y. Z., Deng, C. Y. & Lei, M. G. Cloning and identification of porcine SMPX differentially expressed in F1 crossbreds and their parents. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **38**, 753-758 (2006).
35. Schindeler, A., Lavulo, L. & Harvey, R.P. Muscle costameric protein, Chisel/Smpx, associates with focal adhesion complexes and modulates cell spreading in vitro via a Rac1/p38 pathway. *Exp. Cell Res.* **307**, 367-380 (2005).
36. Hatcher, C.J. & Basson, C.T. Specification of the cardiac conduction system by transcription factors. *Circ. Res.* **105**, 620-630 (2009).

37. Hoogaars, W. M. *et al.* Tbx3 controls the sinoatrial node gene program and imposes pacemaker function on the atria. *Genes Dev.* **21**, 1098-1112 (2007).
38. Christoffels, V. M. *et al.* T-box transcription factor Tbx2 represses differentiation and formation of the cardiac chambers. *Dev. Dyn.* **229**, 763-770 (2004).
39. Schraders, M. *et al.* Next-generation sequencing identifies mutations of SMPX, which encodes the small muscle protein, X-linked, as a cause of progressive hearing impairment. *Am. J. Hum. Genet.* **88**, 628-634 (2011).
40. Huebner, A. K. *et al.* Nonsense mutations in SMPX, encoding a protein responsive to physical force, result in X-chromosomal hearing loss. *Am. J. Hum. Genet.* **88**, 621-627 (2011).
41. Andrés, V., Cervera, M. & Mahdavi, V. Determination of the consensus binding site for MEF2 expressed in muscle and brain reveals tissue-specific sequence constraints. *J. Biol. Chem.* **270**, 23246-23249 (1995).
42. Lints, T.J., Parsons, L.M., Hartley, L., Lyons, I., Harvey, R.P. Nkx-2.5: a novel murine homeobox gene expressed in early heart progenitor cells and their myogenic descendants. *Development.* **119**, 419-31 (1993).
43. Cheng, L. E., Chan, F. K., Cado, D. & Winoto, A. Functional redundancy of the Nur77 and Nor-1 orphan steroid receptors in T-cell apoptosis. *EMBO J.* **16**, 1865-1875 (1997).
44. Tontonoz, P. *et al.* The orphan nuclear receptor Nur77 is a determinant of myofiber size and muscle mass in mice. *Mol. Cell. Biol.* **35**, 1125-1138 (2015).
45. McPherron, A. C., Lawler, A. M. & Lee, S. J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature* **387**, 83-90 (1997).
46. Li, P. *et al.* MicroRNA-638 is highly expressed in human vascular smooth muscle cells and inhibits PDGF-BB-induced cell proliferation and migration through targeting orphan nuclear receptor NOR1. *Cardiovasc. Res.* **99**, 185-193 (2013).

47. Rodríguez-Calvo, R. *et al.* NR4A receptors up-regulate the antiproteinase alpha-2 macroglobulin (A2M) and modulate MMP-2 and MMP-9 in vascular smooth muscle cells. *Thromb. Haemost.* **113**, 1323-1334 (2015).
48. Churchman, A. T. & Siow, R. C. Isolation, culture and characterization of vascular smooth muscle cells. *Methods Mol. Biol.* **467**, 127-138 (2009).
49. Wingate, A. D. *et al.* Nur77 is phosphorylated in cells by RSK in response to mitogenic stimulation. *Biochem. J.* **393**, 715-724 (2006).
50. Rodríguez, C., *et al.* Modulation of ERG25 expression by LDL in vascular cells. *Cardiovasc. Res.* **58**, 178-185 (2003).
51. Guadall, A. *et al.* Fibulin-5 is up-regulated by hypoxia in endothelial cells through a hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1 $\alpha$ )-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* **286**, 7093-7103 (2011).

### Acknowledgments

This work was supported by the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO)- Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) [grants SAF2012-40127, SAF2015-64767-R, PI15/01016, and RD12/0042/0053] and Fundació MARATÓ TV3 20152330. BF and JA were supported by funds provided by Consejo Superior de Investigaciones Científicas and MINECO (JAE pre and FPU programs, respectively). The study was co-funded by Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), a way to build Europe. We are indebted to Prof. Naganari Ohkura and Prof. James Hastie for kindly providing us with the human NOR-1 cDNA, and the plasmid containing the NOR-1-FLAG, respectively.

### Author contributions

JMG designed and supervised the study, interpreted data and wrote the manuscript. BF, IMP, JA, RRC and SA performed experiments and analysed and interpreted data. FV analysed data and contribute to manuscript draft writing. CR conceived specific experiments, analysed data and

contribute to manuscript draft writing. All authors were involved in writing the paper and gave their final approval of the submitted version.

### Conflict of interest

There is no conflict of interest

### Figure legends

**Figure 1. Lentiviral NOR-1 over-expression induces phenotypic changes in human VSMC and up-regulates SMPX.** VSMC were transduced with lentiviral vectors to over-express NOR-1 (pLVX/NOR-1; pNOR-1), a FLAG-tagged derivative form of NOR-1 (pLVX/NOR-1-FLAG; pNOR-1F) or with control lentiviral vectors (pLVX or the EGFP expression vector [pLVX/EGFP; pGFP]). **(a)** Immunofluorescence microscopy analysis showing FLAG-tagged NOR-1 (green), filamentous actin (F-actin stained with phalloidin, red) and nuclei (Hoechst stain, blue). **(b)** Expression levels (analyzed by real-time PCR) of a panel of genes related to cell shape/morphology encoding for cytoskeleton and cytoskeletal-associated proteins in control cells (white bars) and cells transduced with pNOR-1F (black bars): ACTA2 (smooth muscle  $\alpha$ -2 actin), MYH10 (myosin heavy chain 10), TPM1 (tropomyosin 1), TAGLN (transgelin), CALD1(1) (caldesmon transcript specific for smooth muscle cells), CALD1(2) (caldesmon transcript ubiquitously expressed, encoding for a light form of the protein [I-CaD]), ACTB ( $\beta$ -actin), PXN (paxillin) and SMPX (small muscle protein, X-linked) (n = 6). \*, P < 0.0001 vs. cells transduced with pGFP. **(c)** CALD1(2) and SMPX mRNA levels in VSMC transduced with pNOR-1 or with control lentiviral vectors. Data were normalized as in (b) (n = 6). \*, P < 0.0001 vs. cells transduced with pLVX. **(d)** Representative Western blot showing protein levels of NOR-1, SMPX, I-CaD, MYH10 and  $\beta$ -actin in VSMC over-expressing NOR-1 and control cells (n = 4).

**Figure 2. Human SMPX promoter activity is regulated by NOR-1.** (a) Scheme showing the four putative NBRE elements present in the SMPX promoter region cloned into the pGL3 reporter vector (pGL3/SMPX-2260). The consensus NBRE sequence (NBRE c.s.) is indicated and non-conserved bases are shown in bold. (b) Luciferase activity from cells co-transfected with a NOR-1 expression vector (pCMV5/NOR-1; black bars) or the corresponding empty plasmid (pCMV5; white bars) together with different pGL3/SMPX constructs. The activity of constructs mutated in the NBRE site (deleted white circle) is also shown. The core of the NBRE(-167/-160) is indicated and changes introduced by mutagenesis on constructs are boxed (n = 6). \*, P < 0.0001 vs. cells co-transfected with pCMV5/EGFP; #, P < 0.0001 vs. cells co-transfected with pCMV5/NOR-1 and SMPX constructs containing the native NBRE(-167/-160) site. (c) Representative autoradiograms of EMSA performed with a SMPX probe containing the NBRE(-167/-160) site (NBRE) and nuclear protein extracts from VSMC transduced with lentiviral vectors to express NOR-1-FLAG (pNOR-1F) or EGFP (pGFP). The position of the complexes up-regulated by NOR-1 (I and II) is indicated. Competition assays with a molar excess of unlabeled probe (100-fold; Competitor) and supershift assays with a specific antibody against the FLAG sequence (anti-FLAG Ab) were performed. EMSA carried out with a mutated NBRE probe (mut-NBRE) is also shown. SS: supershifted complex. (d) The relative *in vivo* association of NOR-1 with SMPX promoter was analyzed by CHIP assays in VSMC transduced with pGFP or pNOR-1F. Immunoprecipitations were performed with an antibody against the FLAG sequence (IP:FLAG) or a non-specific IgG (IP:IgG). The bars graph shows the enrichment of NOR-1 binding quantified by real-time PCR using SMPX promoter specific primers. Data were normalized to the total input DNA (n = 4). \*, P = 0.0002 vs. pGFP. The panel on right shows the agarose gel electrophoresis of PCR products. Equal input DNA and control IgG immunoprecipitations are shown.

**Figure 3. NOR-1 knockdown down-regulates SMPX expression.** (a) HSMM were transfected with a siRNA against NOR-1 (siNOR-1; black bars) or a random siRNA (siRd; white bars). The expression of

NOR-1 and that of SMPX in these samples was analyzed by real-time PCR (upper panel) (n = 6). \*, P < 0.0001 vs. siRd. The down-regulation of SMPX by siNOR-1 was also analyzed by Western blot (lower panel). Levels of  $\beta$ -actin were used as a loading control. **(b)** HSMM were differentiated to myotubes, and then were transfected with siNOR-1 or siRd. NOR-1 and SMPX mRNA levels (upper panel) and protein levels (lower panel) were analyzed as indicated in (a) (n = 6). \*, P < 0.0001, and #, P = 0.0002 vs. siRd.

**Figure 4. HSMM differentiation up-regulates the expression of NOR-1 and SMPX. (a)**

Microphotographs from HSMM maintained in normal growth medium (Non-differentiated; ND) or exposed to differentiation medium (Differentiated; D) to induce myotube formation. **(b)** mRNA levels of NOR-1 and SMPX in non-differentiated HSMM (white bars) and differentiated cells (black bars) (n = 6). \*, P < 0.0001 vs. ND. **(c and d)** Protein levels of NOR-1 and SMPX analyzed by Western blot **(c)** and immunocytochemistry **(d)** in cells as indicated in (a). Levels of  $\beta$ -actin were used as a loading control in Western blot experiments. In (d), NOR-1 (green), SMPX (green) and nuclear staining (blue) are shown. Bars: 25  $\mu$ m.

**Figure 5. NOR-1 knockdown prevents HSMM differentiation and down-regulates SMPX expression.**

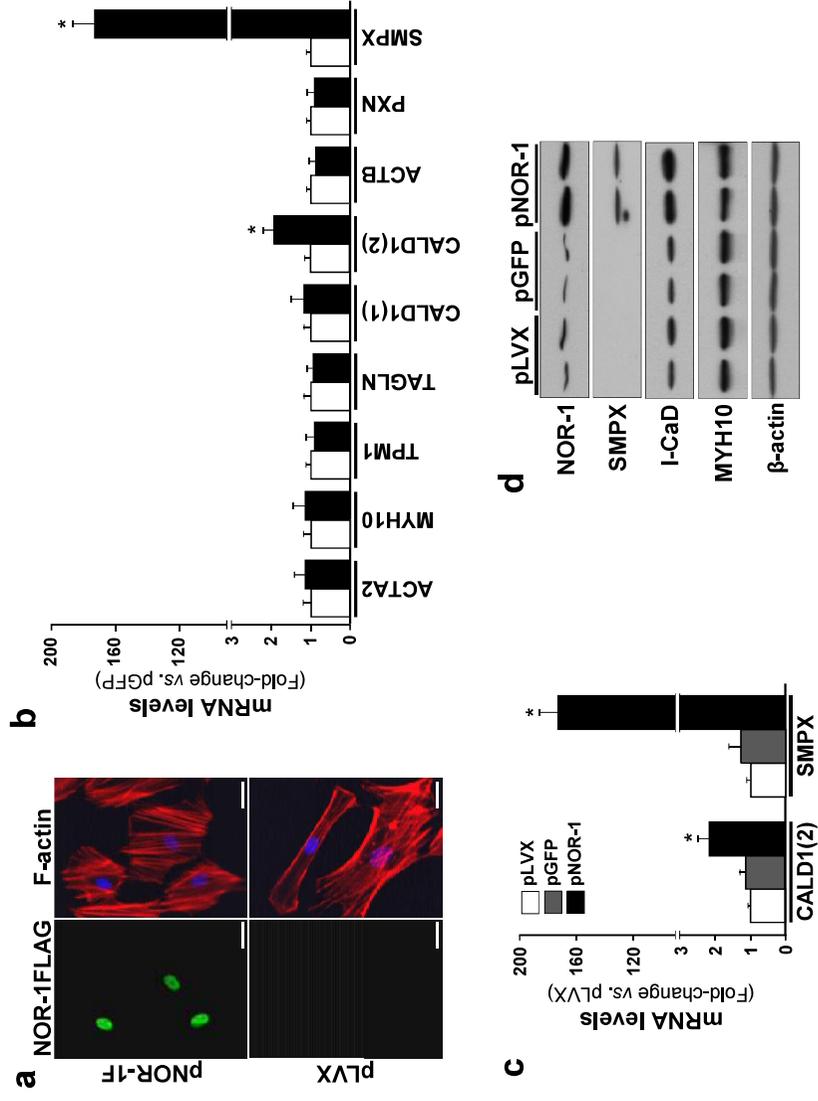
HSMM were transfected with a siRNA against NOR-1 (siNOR-1) or a control random siRNA (siRd), and then were exposed to differentiation conditions during five days. **(a)** Microphotographs (left) and immunofluorescence microscopy analysis showing filamentous actin (F-actin stained with phalloidin; right) from HSMM treated as indicated above. **(b)** NOR-1 and SMPX mRNA levels in cells transfected with siNOR-1 (black bars) or with siRd (white bars) (n = 6). \*, P < 0.0001 vs. siRd. **(c)** Representative Western blot showing protein levels of NOR-1, SMPX, and cell markers associated to HSMM differentiation (MyHC and p27) in HSMM treated as indicated above. Levels of proteins in non-transfected HSMM, both differentiated (D) and non-differentiated (ND), are also shown. Levels of  $\beta$ -

actin were used as a loading control (n = 4). (d) Immunofluorescence microscopy analysis showing NOR-1 (green), SMPX (green) and MyHC (green) in cells as indicated in (a). Nuclear staining using Hoechst (blue) is also shown. Bars: 25  $\mu$ m.

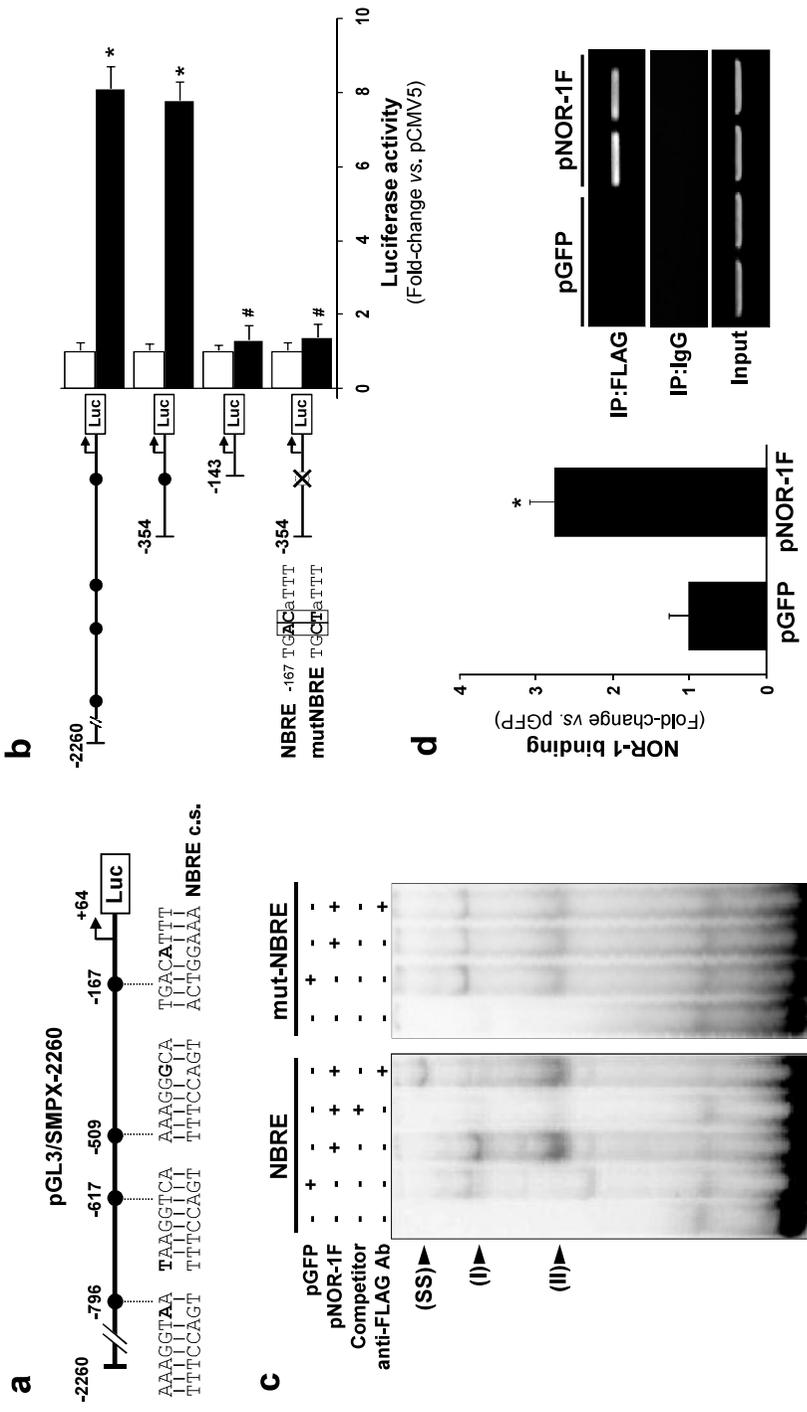
**Figure 6. NOR-1 knockdown prevents the binding of NOR-1 to SMPX promoter.** HSMM cells were transfected or not with a siRNA against NOR-1 (siNOR-1) or a control random siRNA (siRd), and then were exposed to differentiation conditions during five days (black bars). Non-differentiated HSMM were used as a control (white bars). The relative *in vivo* binding of NOR-1 to the human SMPX promoter was analyzed by ChIP assays. Immunoprecipitations were performed with an antibody against NOR-1 (IP:NOR-1) or a non-specific IgG (IP:IgG). The bars graph shows the levels enrichment of NOR-1 quantified by real-time PCR using SMPX promoter specific primers. Data were normalized to the total input DNA (n = 6). \*, P < 0.0001 vs. non-differentiated HSMM; #, P < 0.0001 vs. differentiated HSMM transfected or not with siRd. The bottom panel shows the agarose gel electrophoresis of PCR products. Equal input DNA and control IgG immunoprecipitations are shown.

**Figure 7. SMPX silencing does not affect HSMM differentiation.** (a) Microphotographs from HSMM transfected with a siRNA against SMPX (siSMPX) or a control random siRNA (siRd) and then exposed to differentiation medium during five days. (b) SMPX mRNA levels (upper panel) and protein levels of SMPX, MyHC and p27 (lower panel) in HSMM treated as indicated in (a) (n = 6). \*, P < 0.0001 vs. siRd. Levels of  $\beta$ -actin were used as a loading control. (c) Immunocytochemistry for MyHC and phalloidin-stained F-actin in cells treated as indicated in (a). Bars: 25  $\mu$ m.

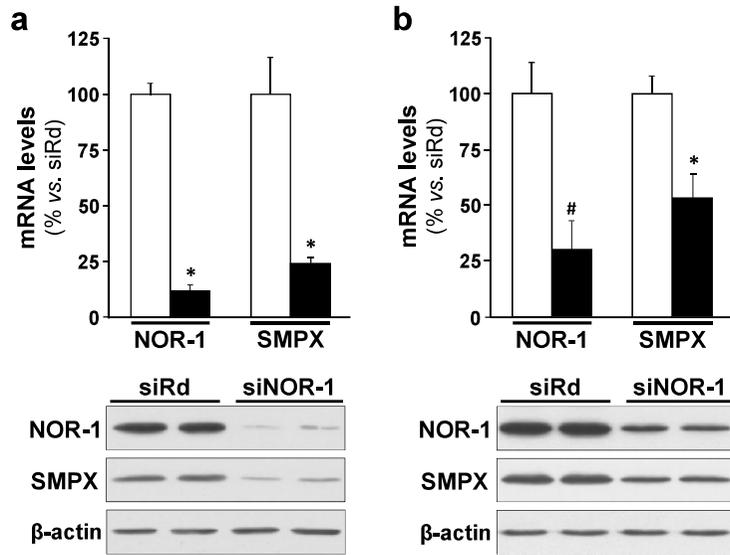
**Figure 1**



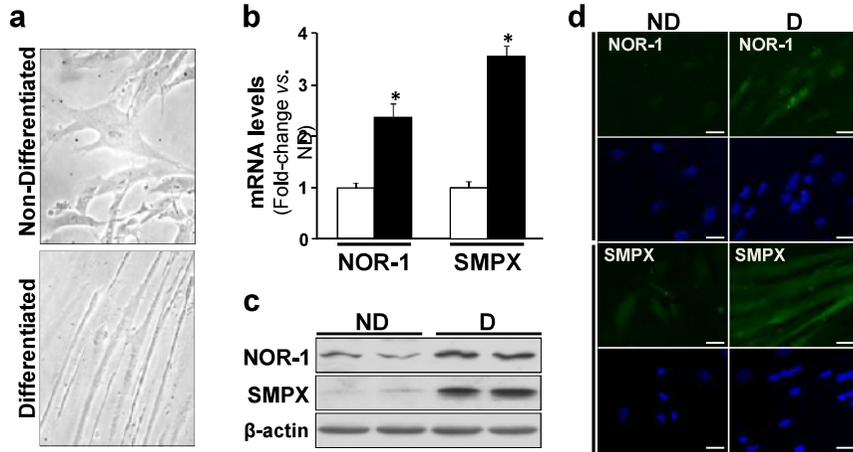
**Figure 2**



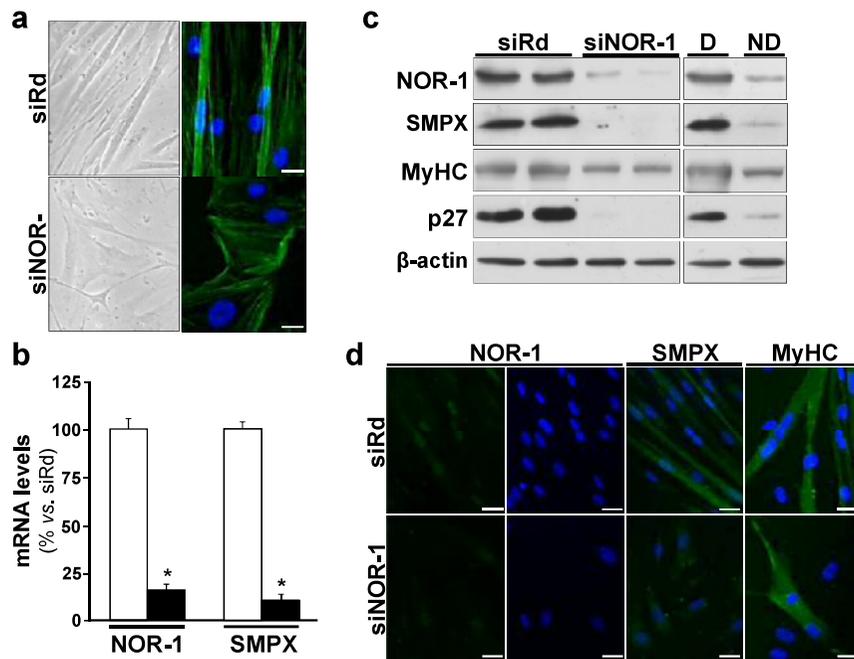
**Figure 3**



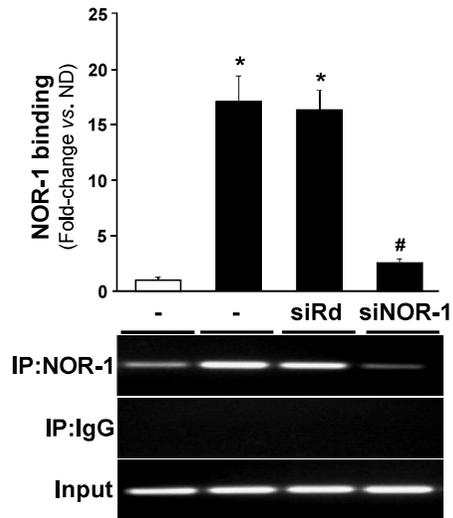
**Figure 4**



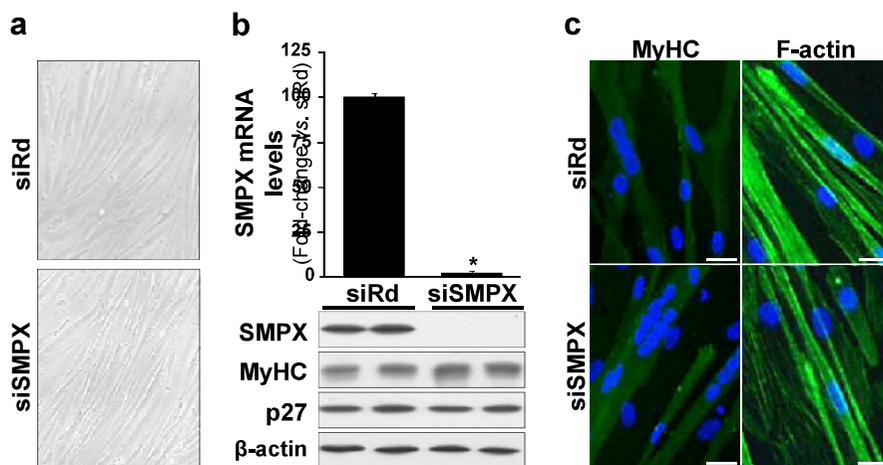
**Figure 5**



**Figure 6**



**Figure 7**



## Supplementary Information

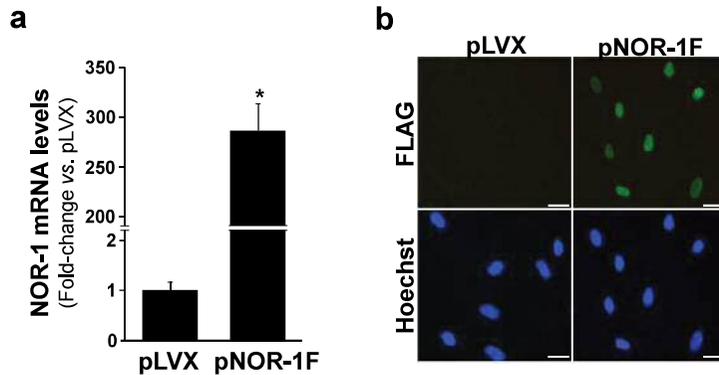
### **The nuclear receptor NOR-1 regulates the small muscle protein, X-linked (SMPX) and myotube differentiation**

Beatriz Ferrán<sup>1</sup>, Ingrid Martí-Pàmies<sup>1</sup>, Judith Alonso<sup>1</sup>, Ricardo Rodríguez-Calvo<sup>1</sup>, Silvia Aguiló<sup>1</sup>, Francisco Vidal<sup>2</sup>, Cristina Rodríguez<sup>1\*</sup> & José Martínez-González<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación Cardiovascular, CSIC-ICCC, IIB-Sant Pau, c/Sant Antoni Maria Claret 167, 08025 Barcelona, Spain. <sup>2</sup>Unitat de Diagnòstic i Teràpia Molecular, Banc de Sang i Teixits, Passeig Vall d'Hebron 119-129, Barcelona 08035, Spain.

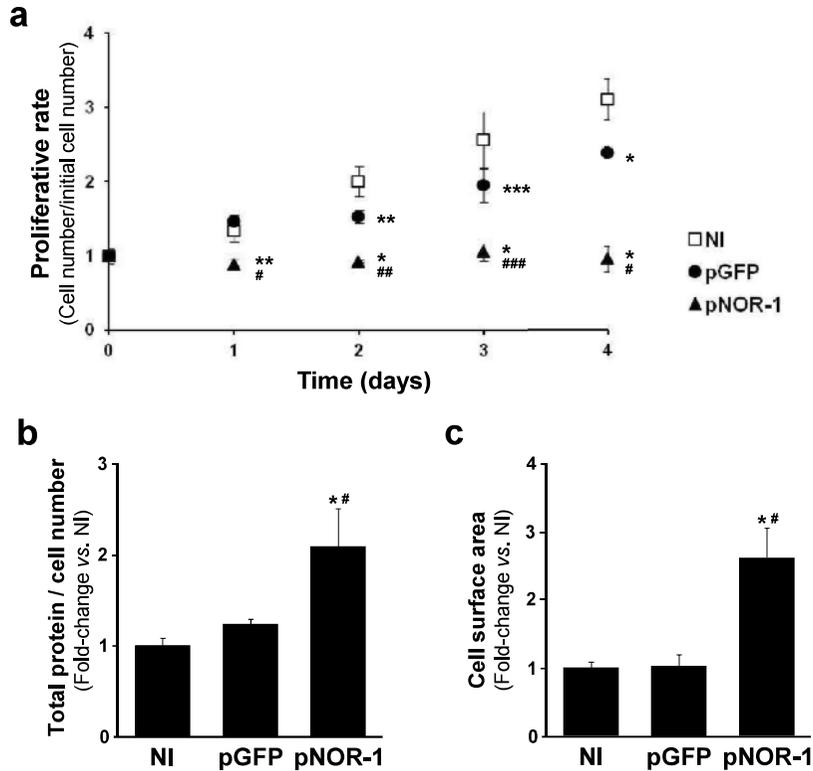
\* The last two authors contributed equally to this work

## Supplementary Fig. S1



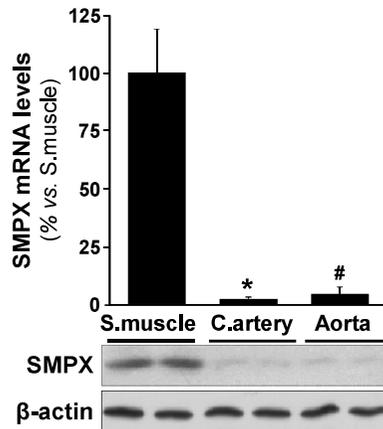
**Supplementary Fig. S1. Lentiviral over-expression of NOR-1 in human VSMC.** (a) Human VSMC were transduced with pLVX or pLVX/NOR-1-FLAG (pNOR-1F) lentivirus, and NOR-1 over-expression was verified by real-time PCR (n = 6). \*P < 0.0001 vs. cells transduced with pLVX. (b) Immunocytochemical analysis for NOR-1 using an antibody against the FLAG sequence (FLAG), from cells transduced as indicated in (a). Bottom panels: fluorescent labelling of nuclei using Hoechst. Bars: 25  $\mu$ m.

## Supplementary Fig. S2



**Supplementary Fig. S2. Lentiviral NOR-1 over-expression reduces VSMC proliferative rate and promotes VSMC hypertrophy.** (a) VSMC were transduced with a lentiviral vector to over-express NOR-1 (pLVX/NOR-1; pNOR-1), or a control lentiviral vector expressing EGFP (pLVX/EGFP; pGFP), and the proliferative rate of VSMC cultures was determined by daily cell counting. Non-infected cells (NI) were used as a control. (b and c) Relative cellular protein content (total protein content/ cell number) (b) and relative cell surface area (c) of VSMC treated as indicated in (a). \*, \*\*, \*\*\*,  $P < 0.0001$ ,  $P = 0.002$ ,  $P = 0.0077$ , respectively vs. NI. #, ##, ###,  $P < 0.0001$ ,  $P = 0.0003$ ,  $P = 0.0006$ , respectively vs. pGFP.

### Supplementary Fig. S3



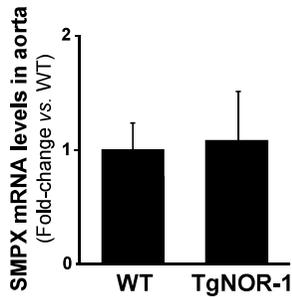
**Supplementary Fig. S3. SMPX is expressed in human arteries.** (a) SMPX mRNA levels determined by real-time PCR in human skeletal muscle (S. muscle; n = 4), and human vessels: coronary arteries (C. artery; n = 7) and aorta (n = 6). Data are expressed as mean  $\pm$  s.e.m. \*P = 0.0001 and #P = 0.0003 vs. S. muscle. (b) Representative Western blot showing SMPX protein levels in these tissues. Levels of  $\beta$ -actin were used as a loading control in Western blot experiments.

## Supplementary Fig. S4

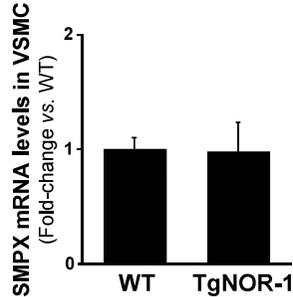
**a**

	NBRE c.s. TGACCTTT
Human	AAGTAAGATACCATAGCCACCTCCCGGCTGACATTTGAGC-CTGCTTCCGCACGGTCAAGCCT
Orangutan	AAGTAAGATACCATAGCCACCTCCCGGCTGACATTTGAGC-gcttTccgCaCggtcaggecctT
Chimpanzee	AAGTAAGATACCATAGCCACCTCCCGGCTGACATTTGAGC-gcttTccgCaCggtcaagcctT
Gorilla	AAGTAAGATACCATAGCCACCTCCCGGCTGACATTTGAGC-gcttTccgCaCggtcaggecctT
Cow	A-GTAAGATtCCAgAGCCACCTtCCCGGCTGACATTTGAGCcCTGCTTTCaGCACGGTCAAGCCT
Pig	A-GTAAGATtCCgTAGCCACCTtCCCGGCTGACATTTGAGCcCTGCTTTCaGCACGGTCAAGCCT
Mouse	A-GaAAGATAaCgTAGCCACCTCCaGGCTGAtATcTGAGCcCTGCTTTCaCAGGTCAAGCCT
Rat	A-GTAAGATAaCgTAGCCACCTCCaCgCTGAtATcTGAGCcCTGCTTTCaCAtGGTCAAGCCT

**b**

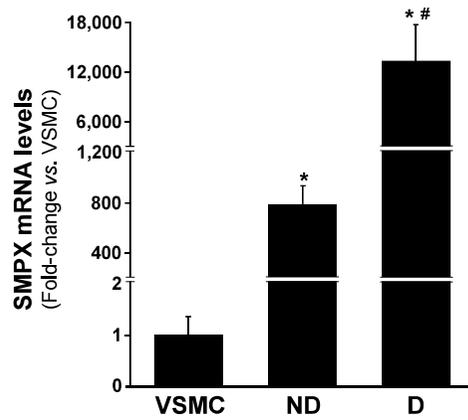


**c**



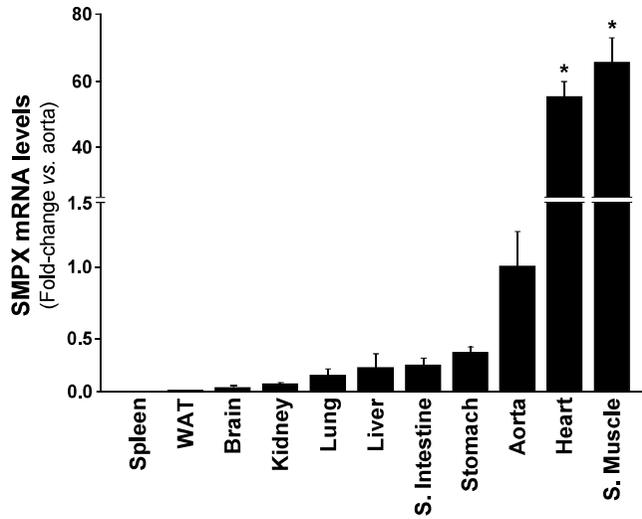
**Supplementary Fig. S4. SMPX does not seem to be regulated by NOR-1 in mouse.** (a) Alignment of the proximal region corresponding to the SMPX promoter from different species including human and mouse. Non-conserved positions are indicated in lower case. The NBRE consensus sequence (NBRE c.s.) is shown at the top. (b and c) SMPX was not regulated by NOR-1 transgenesis in mice. SMPX mRNA levels were analyzed by real-time PCR in mouse aorta from wild-type (WT; n = 7) and transgenic mice that specifically over-express human NOR-1 in VSMC (TgNOR-1; n = 9) (b), and in cultures of VSMC from these animals (n = 6) (c). Data are expressed as mean  $\pm$  s.e.m.

## Supplementary Fig. S5



**Supplementary Fig. S5. SMPX is highly expressed in HSMM.** mRNA levels of SMPX (analysed by real-time PCR) in human VSMC, and in HSMM non-differentiated (ND) and differentiated (D) to myotubes (after the exposition to 2% horse serum during five days) (n = 6). \*P < 0.0001 vs. VSMC; #P < 0.0001 vs. ND.

## Supplementary Fig. S6



**Supplementary Fig. S6. SMPX expression in mouse tissues.** Expression levels of SMPX analysed by real-time PCR in a set of mouse tissues. WAT: white adipose tissue; S. intestine: small intestine; S. muscle: skeletal muscle. Data are expressed as mean  $\pm$  s.e.m. (n = 7). \*P < 0.0001 vs. aorta.









