

Universidad Autónoma de Madrid  
Departamento de Biología Molecular  
Doctorado en Biociencias Moleculares



# **Efectos de la delección condicional de *Rcan1* en el remodelado patológico de la pared vascular**

## **Effects of conditional deficiency of *Rcan1* in pathological vascular wall remodeling**

**Tesis doctoral**

**Silvia Villahoz Lázaro**

**Madrid, 2018**



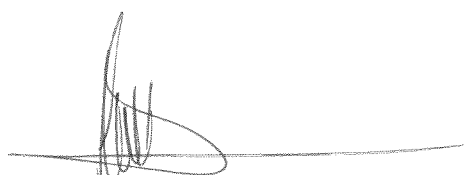
Los doctores Juan Miguel Redondo Moya, Investigador Senior en el Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, y Miguel R. Campanero García, Científico Titular del CSIC

### **CERTIFICAN**

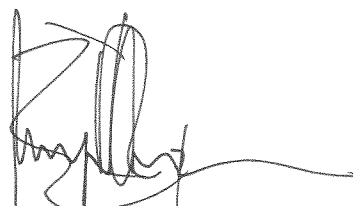
que Dña. Silvia Villahoz Lázaro, Licenciada en Biotecnología por la Universidad de León y Máster en Biomedicina Molecular por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo de Tesis Doctoral que lleva por título: Efectos de la delección de Rcan1 en el remodelado patológico de la pared vascular.

Revisado el presente trabajo, expresamos nuestra conformidad para la presentación del mismo en el Departamento de Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid, por considerar que reúne los requisitos necesarios para ser sometido a su evaluación ante el tribunal correspondiente, para optar al grado de Doctora en Biociencias Moleculares.

En Madrid, a 24 de julio de 2018



Dr. Juan Miguel Redondo Moya  
Investigador Senior CNIC



Dr. Miguel R. Campanero García  
Científico Titular CSIC



Esta tesis ha sido realizada en el Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares bajo la dirección del Dr. Juan Miguel Redondo Moya y el Dr. Miguel Campanero García. Silvia Villahoz Lázaro ha disfrutado de una beca de formación de personal investigador FPI-Severo Ochoa (SVP-2013-067777).



Esta tesis, y todo lo que ella ha implicado, ha sido realizada con la participación y colaboración de muchas personas a quien les agradezco sinceramente sus aportaciones. En primer lugar y como no podría ser de otra manera, gracias **Juanmi**, director de esta tesis, por confiar desde el principio en mi capacidad para llevar a cabo este proyecto y darme la oportunidad de desarrollarlo hasta el final. Igualmente, gracias **Miguel** por tu interés, implicación y tiempo dedicado. A los dos os agradezco la minuciosidad y detalle en la supervisión y correcciones.

Gracias a todas las luchadoras, warriors del café o de las hierbas o de los buenos momentos:

A **Bea**: tú eres posiblemente la mejor parte de esta tesis. Trabajar a tu lado ha sido siempre fácil y agradable, tu trabajo ha sido impecable y de alguna manera esta tesis también lleva tu firma. Gracias por creer en mí, apoyarme y valorarme siempre tanto, tus empujoncitos han sido más importantes de lo que crees. Me siento muy feliz de haber compartido estos años contigo, y lo mejor de todo, sé que nuestra amistad tiene por delante muchos más años por compartir. Eres auténtica.

A **Nere**, por todo lo que me has enseñado, por todo el legado científico y experimental y por tu naturalidad. Has sido una gran maestra y ejemplo a seguir, y siempre me ha ayudado sentirme comprendida por ti. Tu buen rollo y alegría son tan contagiosos que te he echado siempre en falta como la mejor compañera de bench.

A **Katia**, tambor siempre en marcha y contrarreloj. Sólo en 3 meses me enseñaste a pensar, trabajar y sobrevivir en un laboratorio, y además lo hiciste muy bien. Y aunque hayas estado “lejos” la mayor parte del tiempo, siempre has estado muy cerca cuando te he necesitado. Gracias por tu ayuda y tus ánimos.

A **Lizet**, doña, imilla y millones de motes más... Me has ayudado mucho en la última etapa de esta tesis, y no sólo con trabajo, sino también con risas, compañía y muy buenos momentos. Gracias por todas esas charlas profundas y superfluas al mismo tiempo, gracias por los botellines inesperados que nos daban siempre la vida.

A **Jorge**, también luchador en una mayoría de mujeres, ya sabes que “eres una más”. Contigo he aprendido cosas de lo más variopintas, que pueden ir desde la amplia variedad de parásitos humanos hasta la siempre útil capacidad para asentir. Gracias por compartir tu trabajo y curiosidades conmigo.

## Agradecimientos

---

A **Andrea**, gracias por aportar perspectiva, sentido común y normalidad a todas esas montañas que nos hacíamos de un granito de arena. Tienes una fuerza contagiosa, siempre me ha gustado tenerte cerca.

A **MJ**, gracias por los buenos ratos que hemos compartido incluyendo reflexiones científicas y risas absurdas. Has hecho que las meriendas se conviertan en una verdadera tradición. Con tu trabajo, tus ganas y tu apetito investigador me has regalado un poco de esperanza.

A **Vanesa**, eres un verdadero ejemplo de integridad. Gracias por tus ánimos y comprensión.

A **Helena**, gracias por tu empatía, por escuchar y tener siempre una frase amable y reparadora. Me quedo con la para mí más mítica frase: “hay que tener perspectiva”.

Gracias a los pilares del laboratorio, memorias de protocolos y bancos de sabiduría en biología molecular: **Sara, Loli y Pablo**. Después de estos seis años en el laboratorio necesariamente he aprendido la ley del orden y la limpieza, el lugar y el orden de todo y de todos.

**Paula**, te agradezco de verdad el tiempo que has tenido que dedicar a este proyecto, así como que hayas sido siempre tan afable incluso cuando, irremediablemente, yo he sido difícil de tratar.

Agradezco a **Rut, Alicia y Josué** que me hayan llevado al límite. Gracias a vosotros he desarrollado gran capacidad de resiliencia, seguridad en mi misma, y he descubierto a mis mejores apoyos en los momentos críticos. Más especialmente estoy agradecida a **Josué**, de quién he aprendido cómo es la ciencia y lo difusos que son los límites de la ambición.

Gracias al pequeño gran grupo de las Sanchas, las siete maravillas, la mejor panda de amigas que cualquiera podría desear. Un fin de semana con vosotras es suficiente para desconectar y olvidar casi cualquier problema. **Merisón, Elisón, Ire, Angelita, Helonthrio y Clarus**: sencillamente gracias por estar siempre ahí amigas.

Gracias a mi familia, pues no dejo de ser vuestro reflejo. **Rodri**, siempre me has guiado con tu ejemplo, he querido imitarte y seguir tus pasos, y creo que gracias a eso me ha ido bastante bien. En realidad creo que la gente tiene razón cuando dice que nos parecemos, y tal vez por eso nos entendamos (a veces en silencio). Gracias por ser sincero, apoyarme, creer en mí, reírte de mí y reírte conmigo. Millones de gracias a mis padres, porque habéis dado lo mejor de vosotros para que Rodrigo y yo seamos como somos hoy en día. Siempre me ha gustado reírme de los “defectos” heredados de cada uno de vosotros y muy pocas veces os he dicho lo mejor que me habéis dado. **Papá**, he aprendido de tu paciencia y templanza, la misma que has usado para criarme, enseñarme y muy pocas veces regañarme. A veces me he reído de lo mucho que piensas las cosas, ahora creo que mi espíritu analítico ha nacido precisamente en ti. Gracias a ti he aprendido a tomarme las cosas con más calma. Gracias por encontrar siempre la solución de TODO. **Mamá**, siempre tan comprensiva conmigo, animándome a dar mis pasitos, mis creaciones, mis proyectos y todos mis “mis”. Siempre me has hecho creer que si quiero hacer algo, yo puedo hacerlo. Gracias por comprenderme y empujarme cuando dudaba. Los tres habéis estado muy presentes siempre, y formáis parte de lo que esta tesis ha supuesto para mí.

**Andrés**, tú que tienes tantos nombres para mí, tú que eres la mejor parte del todo. Gracias es poco, pero es una forma de empezar. Gracias por la paciencia y la comprensión con la que has estado siempre a mi lado, y por seguir también a mi lado cuando la paciencia flaqueaba y nada parecía tener mucho sentido. Tú sabes mejor que nadie lo que esta etapa ha significado, tú sabes también lo que significa llegar al final. Ha sido duro para todos, pero sin tu ayuda habría sido misión imposible. Gracias por arroparme, por creer en mí, por la fuerza que me das, por enseñarme que yo también soy fuerte. Gracias por ser mi amigo y mi amor a la vez. Ahora, ya está, nos espera la mejor parte.



Índice





<b>ABREVIATURAS</b> .....	11
<b>RESUMEN</b> .....	17
<b>SUMMARY</b> .....	21
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	25
1. El sistema cardiovascular.....	27
1.1. Los vasos sanguíneos.....	27
1.1.1. Arteria Aorta.....	28
1.1.2. Arterias carótidas.....	28
1.1.3. <i>Vasa vasorum</i> .....	29
1.2. Estructura de las arterias.....	29
1.3. Fisiología del sistema cardiovascular.....	30
1.3.1. Regulación de la PA: sistema Renina-Angiotensina.....	31
1.3.2. Señalización molecular mediada por Ang-II.....	32
2. El remodelado vascular.....	33
2.1. Clasificación del remodelado vascular patológico.....	34
2.2. Síndrome aórtico agudo (SAA).....	34
2.2.1. Disección aórtica (DA).....	35
2.2.2. Úlcera aterosclerótica penetrante (UAP).....	36
2.2.3. Hematoma Intramural (HIM).....	36
2.3. Aneurisma aórtico.....	37
2.4. Formación de neoíntima.....	38
2.5. Mecanismos moleculares de remodelado vascular.....	38
2.5.1. Ruta de señalización de RhoA.....	39
2.5.2. Ruta de señalización de Calcineurina.....	40
3. Regulador de Calcineurina 1: RCAN1.....	40
3.1. Familia de proteínas RCAN.....	40
3.2. Rcan1.....	41
3.2.1. Regulación transcripcional de Rcan1.....	41
3.2.2. Regulación post-traducciona l de Rcan1.....	42
3.2.3. Implicaciones de Rcan1 en patologías.....	42
<b>OBJETIVOS</b> .....	45
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	49
1. Animales.....	51

## Índice

---

2. <i>Southern blot</i> .....	55
3. Modelos animales.....	58
3.1. Tratamiento con tamoxifeno.....	58
3.2. Infusión de Ang-II en modelo de HIM en ratón.....	58
3.3. Modelo de desarrollo de AAA por infusión de Ang-II.....	59
3.4. Modelo de permeabilidad <i>in vivo</i> .....	59
3.5. Modelo de formación de neoíntima por ligación de carótida.....	60
4. Cultivos celulares.....	61
4.1. Células de músculo liso vascular (CMLVs) de ratón.....	61
4.2. Células endoteliales de pulmón de ratón (MLECs).....	61
4.3. Células endoteliales humanas de vena de cordón umbilical (HUVEC).....	62
4.4. Células embrionarias de riñón humano (HEK 293T).....	62
4.5. Células Jurkat.....	62
5. Transfección.....	62
5.1. HEK 293T (para producción de partículas lentivirales).....	62
5.2. HUVEC.....	63
6. Producción de vectores lentivirales.....	63
7. Transducción de CMLVs con vectores lentivirales.....	64
8. Ensayos de permeabilidad <i>in vitro</i> .....	64
9. Microscopía electrónica de transmisión.....	64
10. Análisis histológico.....	65
10.1. Procesamiento de tejidos.....	65
10.2. Inmunohistoquímicas e inmunofluorescencias.....	65
10.3. Detección directa de fluorescencia en experimentos de permeabilidad.....	66
10.4. Tinción de tejido fresco <i>whole mount</i> .....	66
10.5. Tinciones de tejidos con colorantes.....	67
10.5.1. Tricrómico de Masson (T. Masson).....	67
10.5.2. Hematoxilina y Eosina (HE).....	67
10.5.3. Elásticas de Van Gieson (EVG).....	67
11. Extracción de ácidos nucleicos y PCR cuantitativa.....	67
12. Ensayo de secuenciación de ARN para identificación de genes diferencialmente expresados (GDE) por <i>RNAseq</i> .....	68
13. Inmunoprecipitación (IP).....	69
14. <i>Immunoblot</i> .....	69
15. Análisis proteómico.....	71
16. Análisis estadístico.....	71

<b>RESULTADOS</b> .....	73
Generación de ratones modificados genéticamente para la delección inducible de <i>Rcan1</i> .....	75
1. Las construcciones genéticas son diseñadas mediante la inserción de sitios loxP en el gen diana y la recombinación controlada por ratones que expresan Cre <sup>ERT2</sup> en tejidos específicos.....	75
2. La actividad de la recombinasa Cre induce la delección en los ratones modificados genéticamente.....	76
2.1. CMLVs obtenidas de los ratones modificados genéticamente presentan la delección en el gen <i>Rcan1</i> mediada por la recombinasa Cre.....	76
2.2. La delección en las isoformas de <i>Rcan1</i> es detectada en músculo liso o endotelio tras la administración del inductor tamoxifeno.....	77
La delección inducible de <i>Rcan1</i> en endotelio o musculo liso predispone a la formación de lesiones aórticas agudas tras la administración de Ang-II.....	79
1. La ausencia de las distintas isoformas de <i>Rcan1</i> en cada uno de los compartimentos presenta un fenotipo más leve de HIM en presencia de Ang-II.....	83
2. La hipertensión arterial es el inductor de las lesiones aórticas agudas.....	86
2.1. El tratamiento anti-hipertensivo con amlodipino previene la formación de DAs y de HIMs inducida por Ang-II.....	86
2.2. El incremento de la PA con fármacos diferentes a la Ang-II genera HIMs en los animales con delección en <i>Rcan1</i> .....	86
3. Los HIMs evolucionan a AAA en animales deficientes en <i>Rcan1</i> tratados con Ang-II durante 28 días.....	89
4. Los pasos iniciales en la formación del HIM sugieren la implicación de vasos perivasculares y la alteración de la homeostasis de la pared arterial.....	93
4.1. Tratamientos cortos con Ang-II (6h) generan HIMs incipientes con hemorragias en las capas más externas de la túnica media.....	93
4.2. La delección inducible de <i>Rcan1</i> aumenta la permeabilidad vascular en aorta.....	94
5. Alteración de la homeostasis de la pared vascular en ratones con delección de <i>Rcan1</i> : activación de Gsk-3 $\beta$ y p-MLC.....	96
5.1. La estructura de la pared vascular está comprometida como consecuencia de la delección inducible de <i>Rcan1</i> .....	96
5.2. La delección de <i>Rcan1</i> conduce a la fosforilación de la cadena ligera de la miosina (p-MLC).....	98
5.3. La activación de MLC está mediada por Gsk-3 $\beta$ .....	99
5.4. La inhibición farmacológica de Rock previene la activación de MLC y la formación de HIMs y DAs letales.....	101

6. Los efectos de la delección de <i>Rcan1</i> en otros tejidos no aórticos.....	104
6.1. No se detectan HIMs en otros tejidos diferentes de la aorta.....	104
6.2. La delección condicional de <i>Rcan1</i> produce alteraciones en el músculo liso del aparato reproductor y urinario masculino.....	104
Papel de <i>Rcan1</i> en formación de neoíntima.....	106
1. La ausencia de <i>Rcan1</i> protege de la formación de neoíntima.....	107
2. La delección de <i>Rcan1</i> -1 o de <i>Rcan1</i> -4 protege frente a la formación de neoíntima.....	108
Identificación de genes comúnmente regulados en la aorta de ratones con delección inducida de <i>Rcan1</i> en el endotelio y músculo liso.....	108
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>111</b>
Los ratones con delección inducible de <i>Rcan1</i> : un modelo prometedor que recapitula el HIM en la enfermedad humana.....	113
Fenotipos causados por la delección inducible <i>versus</i> la delección constitutiva de <i>Rcan1</i> .....	113
Redundancia funcional de <i>Rcan1</i> -1 y <i>Rcan1</i> -4 de origen endotelial y de músculo liso en procesos de remodelado vascular.....	115
La delección inducible y específica de tejido de <i>Rcan1</i> presenta un gran potencial para su uso en otros contextos patológicos.....	116
La formación de los HIMs es causada por un aumento de la PA.....	116
Los HIMs se forman en un estadio incipiente tras 6 horas de tratamiento con Ang-II.....	118
Origen de la sangre en el modelo de HIM de ratones deficientes en <i>Rcan1</i> .....	119
Los HIMs se forman en la aorta y no se detectan en otros vasos u otros tejidos estudiados..	121
La ausencia de <i>Rcan1</i> genera cambios en la ultraestructura de la pared vascular.....	122
La activación de Gsk-3 $\beta$ participa en la activación de mediadores del remodelado vascular.....	122
<i>Rcan1</i> y MLC como dianas terapéuticas y marcadores de sensibilidad a la hipertensión.....	123
La delección inducida de <i>Rcan1</i> , al igual que la constitutiva, protege de la formación de neoíntima.....	124
Comunicación endotelio-músculo liso en la aorta.....	126
<b>CONCLUSIÓN.....</b>	<b>129</b>
<b>CONCLUSIONS.....</b>	<b>133</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>137</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>151</b>
<b>ANEXO II.....</b>	<b>195</b>
<b>ANEXO III.....</b>	<b>231</b>

# Abreviaturas





<b>AAA</b>	Aneurisma de la aorta abdominal ( <i>Abdominal aortic aneurysm</i> )
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	ADN complementario
<b>ADNg</b>	ADN genómico
<b>Amló</b>	Amlodipino
<b>Ang-II</b>	Angiotensina II
<b>ANOVA</b>	Análisis de varianza entre grupos ( <i>Analysis of variance</i> )
<b>AoAsc</b>	Aorta ascendente
<b>AoTor</b>	Aorta torácica (descendente)
<b>AoAbd</b>	Aorta abdominal
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNm</b>	ARN mensajero
<b>AT1R</b>	Receptor de Angiotensina II tipo I
<b>AT2R</b>	Receptor de Angiotensina II tipo II
<b>BAC</b>	Cromosoma artificial bacteriano ( <i>Bacterial artificial chromosome</i> )
<b>BSA</b>	Albúmina de suero bovino ( <i>Bovine serum albumin</i> )
<b>C57BL/6</b>	Animales tipo silvestre
<b>Cd31</b>	PECAM-1 ( <i>Platelet endothelial cell adhesion molecule 1</i> )
<b>CE</b>	Célula endotelial
<b>CMLV</b>	Célula de músculo liso vascular
<b>CN</b>	Calcineurina
<b>CnA</b>	Subunidad A de Calcineurina o Calcineurina A
<b>CnB</b>	Subunidad B de Calcineurina o Calcineurina B
<b>CN-NFAT</b>	Ruta de señalización de Calcineurina y NFAT
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>DA</b>	Disección aórtica ( <i>AD - Aortic dissection</i> )
<b>Dbh</b>	Beta-hidroxilasa de la Dopamina ( <i>Dopamine beta-hydroxylase</i> )
<b>Ddc</b>	Descarboxilasa de la DOPA ( <i>DOPA decarboxylase</i> )
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco Modified Eagle's Medium</i>
<b>DSCR1</b>	Región crítica del síndrome de Down ( <i>Down syndrome critical region 1</i> )
<b>ECA</b>	Enzima convertidora de angiotensina
<b>EC-Rcan1<sup>-/-</sup></b>	Ratón con delección de <i>Rcan1</i> en endotelio
<b>EC-Rcan1-1<sup>-/-</sup></b>	Ratón con delección de la isoforma <i>Rcan1-1</i> en endotelio
<b>EC-Rcan1-4<sup>-/-</sup></b>	Ratón con delección de la isoforma <i>Rcan1-4</i> en endotelio
<b>EVG</b>	Tinción de elásticas Van Gieson
<b>F1</b>	Descendientes de primera generación
<b>FBS</b>	Suero fetal bovino ( <i>Fetal bovine serum</i> )
<b>Fc</b>	Fracción constante de las inmunoglobulinas, aquí de ratón
<b>FDR</b>	Tasa de falsos descubrimientos ( <i>False discovery rate</i> )
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína
<b>GDE</b>	Genes diferencialmente expresados

## Abreviaturas

---

<b>GFP</b>	Proteína verde fluorescente ( <i>Green fluorescent protein</i> )
<b>Gsk-3 <math>\beta</math></b>	Quinasa de la sintasa de glicógeno 3 beta ( <i>Glycogen synthase kinase 3 beta</i> )
<b>HIM</b>	Hematoma intramural ( <i>IMH - Intramural hematoma</i> )
<b>HEK 293T</b>	Células embrionarias humanas de riñón ( <i>Human embryonic kidney cells</i> )
<b>HE</b>	Hematoxilina y eosina, tinción histológica
<b>HUVEC</b>	Célula endotelial de vena de cordón umbilical humano ( <i>Human umbilical vein endothelial cell</i> )
<b>IF</b>	Inmunofluorescencia
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G
<b>IHQ</b>	Inmunohistoquímica
<b>IPA</b>	<i>Ingenuity Pathways Analysis</i> (software comercial)
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>L-NAME</b>	NG-nitro-L-arginina metil éster
<b>loxP</b>	(1) Sitios de recombinación específicos para la recombinasa Cre. (2) Alelo <i>loxP</i> : exón flanqueado por sitios loxP y ausencia de casete de selección (Neo) por recombinación positiva en sitios FRT
<b>LSL</b>	Secuencia de parada flanqueada por sitios loxP ( <i>loxP-STOP-loxP</i> )
<b>Lv</b>	Vector lentiviral. Aquí, esqueleto del plásmido base que contiene información para la expresión de la proteína fluorescente verde (GFP)
<b>Lv-Cre</b>	Vector lentiviral codificante de la recombinasa Cre
<b>Lv-Ctr</b>	Vector lentiviral control, codificante de la proteína fluorescente verde
<b>MEJ</b>	Uniones mioendoteliales o uniones endoteliales-músculo liso ( <i>Myo-endothelial junctions</i> )
<b>MET</b>	Microscopía electrónica de transmisión
<b>MLC</b>	Cadena ligera de miosina ( <i>Myosin light chain</i> )
<b>MLEC</b>	Célula endotelial de pulmón de ratón ( <i>Mouse lung endothelial cell</i> )
<b>MMP</b>	Metaloproteinasas de matriz ( <i>Matrix MetalloProteinases</i> )
<b>Mlck</b>	Quinasa de la cadena ligera de la miosina
<b>Mypt1</b>	Fosfatasa de la cadena ligera de la miosina subunidad 1
<b>Neo-loxP</b>	Alelo <i>Neo-loxP</i> : exón flanqueado por sitios loxP y presencia de casete de selección (Neo) flanqueado por sitios FRT
<b>NFAT</b>	Factores nucleares de células T activadas
<b>NO</b>	Óxido nítrico ( <i>Nitric oxide</i> )
<b>O<sub>2</sub></b>	Oxígeno
<b>OCT</b>	Compuesto de temperatura óptimo para el corte ( <i>Optimal cutting temperature compound</i> )
<b>PA</b>	Presión arterial
<b>PBS</b>	Búfer fosfato salino ( <i>Phosphate buffered saline</i> )
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa ( <i>Polimerase chain reaction</i> )
<b>PFA</b>	Paraformaldehído

<b>p-MLC</b>	Estado fosforilado de la MLC, aquí concretamente en la Serina 19
<b>RCAN1</b>	Regulador de Calcineurina 1 (Rcan1 para ratón)
<b>RCAN1-1</b>	Isoforma larga o 1-1 de RCAN1 (Rcan1-1 en ratón)
<b>RCAN1-4</b>	Isoforma corta o 1-4 de RCAN1 (Rcan1-4 en ratón)
<b>Rcan1<sup>-/-</sup></b>	Ratones deficientes en Rcan1 de forma constitutiva desde el desarrollo
<b>Rcan1<sup>loxP/loxP</sup></b>	Ratones con el exón 6 del gen <i>Rcan1</i> flanqueado con sitios loxP, sin tratamiento con tamoxifeno (fenotipo silvestre)
<b>Rcan1-1<sup>loxP/loxP</sup></b>	Ratones con el exón 1 específico de la isoforma <i>Rcan1-1</i> flanqueado con sitios loxP, sin tratamiento con tamoxifeno (fenotipo silvestre)
<b>Rcan1-4<sup>loxP/loxP</sup></b>	Ratones con el exón 4 específico de la isoforma <i>Rcan1-4</i> flanqueado con sitios loxP, sin tratamiento con tamoxifeno (fenotipo silvestre)
<b>RhodB</b>	Fluoróforo rodamina B
<b>RIN</b>	<i>RNA integrity number-Bioanalyzer</i>
<b>Rock</b>	Quinasa asociada a RhoA
<b>SAA</b>	Síndrome aórtico agudo
<b>SEM o s.e.m.</b>	Error estándar de la media ( <i>Standar error of the mean</i> )
<b>SM</b>	Músculo liso ( <i>Smooth muscle</i> )
<b>SMA</b>	Actina de músculo liso ( <i>Smooth muscle actin</i> )
<b>SM-Rcan1<sup>-/-</sup></b>	Ratón con delección de <i>Rcan1</i> en el músculo liso
<b>SM-Rcan1-1<sup>-/-</sup></b>	Ratón con delección de la isoforma <i>Rcan1-1</i> en el músculo liso
<b>SM-Rcan1-4<sup>-/-</sup></b>	Ratón con delección de la isoforma <i>Rcan1-4</i> en el músculo liso
<b>TBS-T</b>	Tampón Tris con 0,05% de Tween 20
<b>Tg</b>	Alelo modificado genéticamente, genérico
<b>Th</b>	Hidroxilasa de la tirosina ( <i>Tyrosine hydroxylase</i> )
<b>u.a.</b>	Unidades arbitrarias
<b>UAP</b>	Úlcera aterosclerótica penetrante
<b>Ubc-Rcan1<sup>-/-</sup></b>	Ratón con delección ubicua de <i>Rcan1</i> de forma inducible
<b>Wt</b>	Alelo silvestre ( <i>Wildtype</i> ). Alternativamente, animal de fenotipo silvestre ( <i>Wildtype</i> o <i>Rcan1<sup>+/+</sup></i> )
<b>YFP</b>	Proteína amarilla fluorescente ( <i>Yellow fluorescent protein</i> )



# Resumen





El remodelado de la pared vascular es un común denominador en las enfermedades vasculares, incluyendo manifestaciones agudas como el hematoma intramural (HIM) y la disección aórtica (DA), o crónicas como los aneurismas o la formación de neoíntima. La Angiotensina II (Ang-II) es un conocido estímulo remodelador de la pared vascular que afecta ampliamente a la homeostasis del vaso actuando sobre diversos tipos celulares. En estudios anteriores se identificó a *Rcan1*, gen regulado por la ruta calcineurina-NFAT, como mediador del daño vascular inducido por Ang-II. *Rcan1* presenta dos isoformas, *Rcan1-1* y *Rcan1-4*, cuyas funciones en el contexto vascular no habían sido estudiadas por separado hasta el momento. En este trabajo hemos generado por primera vez ratones modificados genéticamente para estudiar el papel de cada isoforma de *Rcan1* en el contexto del remodelado vascular patológico en células de músculo liso vascular (CMLVs), en células endoteliales (CEs) o de forma ubicua. La eliminación de *Rcan1* en ratones adultos predispuso a la inducción de HIM aórticos por Ang-II, que en aproximadamente el 30% de los casos evolucionaron a DA letal en los primeros 7 días de tratamiento. A tiempos más largos, estos HIM o desaparecieron o evolucionaron hacia aneurismas de la aorta abdominal (AAA). Diversos abordajes experimentales mostraron que la formación de HIM y DA estaba mediada por el aumento de presión arterial (PA). Estudios a tiempos tempranos de la inducción de la patología revelaron un aumento de la permeabilidad vascular en ausencia de *Rcan1*, y sugirieron un posible origen perivascular de la hemorragia. Las aortas con delección de *Rcan1* de forma inducible presentaban cambios ultraestructurales con aumento de espacios intercelulares. A nivel molecular, la delección inducida de *Rcan1* causó una activación de la ruta de Gsk-3  $\beta$ , quien a su vez activó la fosforilación de la cadena ligera de la miosina (p-MLC) tanto *in vivo* como en CMLVs cultivadas. Por último, se identificó la activación de MLC como mediador del daño vascular en este modelo. Paradójicamente, los animales deficientes en *Rcan1* de forma constitutiva se comportaron de forma similar a los de genotipo silvestre en este modelo. Asimismo, estudiamos el papel de *Rcan1* en un modelo de formación de neoíntima. La ausencia de *Rcan1* tanto inducida como constitutiva protegió del desarrollo de esta patología. En los dos modelos patológicos estudiados, las isoformas *Rcan1-1* y *Rcan1-4* presentaron funciones análogas y su delección dio lugar a fenotipos similares. En resumen, todos estos resultados aportan una nueva visión sobre la función de *Rcan1* y sus isoformas en el remodelado de la pared vascular.



# Summary





The vascular wall remodeling is a common factor in cardiovascular diseases, including acute manifestations, such as intramural hematoma (IMH) and aortic dissection (AD), and chronic pathologies, such as aneurysm and neointima formation. Angiotensin II (Ang-II) is a well-known mediator of vascular damage that affects different cell types and modifies the homeostasis of the vascular wall. Previous studies have identified Rcan1, transcriptionally regulated by the calcineurin-NFAT pathway, as a mediator of Ang-II-dependent vascular remodeling. *Rcan1* is expressed as two isoforms, Rcan1-1 and Rcan1-4, whose specific function in the vascular context has not been defined. In this thesis, we report the generation of genetically modified mice to conditionally delete each Rcan1 isoform. We used these mice to investigate the contribution of Rcan1 in smooth muscle cells, endothelial cells or ubiquitously, to the pathological vascular wall remodeling. Surprisingly, the induced deletion of *Rcan1* in either vascular cell-type elicited a hypercontractile phenotype and aortic medial layer disorganization, predisposing to hypertension-mediated AD, IMH, and aneurysm. Incipient IMH at 6h of Ang-II treatment showed an increased vascular permeability when Rcan1 was absent in an inducible way. Moreover, the increase in permeability was localized in the “external” layers of the aortic tunica media, suggesting a perivascular origin of the hemorrhage. Ultrastructural changes were detected in aortas from *Rcan1* conditionally deficient mice in the absence of hypertensive conditions, where an increase in intercellular spaces were noticed. A proteomics analysis revealed that Rcan1 interacts with Gsk-3  $\beta$ , whose inhibition decreased myosin activation. Induction of the phosphorylation state of the myosin light chain (p-MLC), which was detected in Rcan1 conditionally deficient aortas, was eventually identified as an important mediator of the vascular damage in this model. Strikingly, constitutively *Rcan1* deficient animals behaved similarly to wild-type mice in this model. Additionally, the role of Rcan1 was studied in a model of neointima formation. Inducible and constitutive Rcan1 deficiency, conferred protection against neointimal growth. In the two pathological models presented in this work, Rcan1-1 and Rcan1-4 isoforms had similar functions and their absence presented analogous phenotypes. In summary, our results contribute to further elucidate the function of Rcan1 and its isoforms in pathological vascular wall remodeling.



# Introducción





## 1. El sistema cardiovascular

El sistema cardiovascular es el encargado de distribuir los nutrientes y el oxígeno ( $O_2$ ) a todas las células del organismo, así como de recoger sus desechos metabólicos. Esta función de intercambio de nutrientes la realiza la sangre, que está en constante circulación. Además de su principal función, el sistema circulatorio también interviene en otros procesos como la regulación de la temperatura corporal o el transporte de células del sistema inmunitario y las hormonas endocrinas, entre otros. El sistema cardiovascular está formado principalmente por el corazón y los vasos sanguíneos.

El **corazón** funciona como una bomba que impulsa la sangre por todo el organismo. Este bombeo se realiza en varias fases. La sangre rica en  $O_2$  es bombeada desde el ventrículo izquierdo por las arterias a todo el cuerpo, y retorna como sangre rica en dióxido de carbono ( $CO_2$ ) a la aurícula derecha, de donde pasa al ventrículo derecho. Desde el ventrículo derecho la sangre sale por las arterias pulmonares hacia los pulmones, donde por intercambio gaseoso pierde  $CO_2$  y se enriquece en  $O_2$ , para retornar a la aurícula izquierda y pasar al ventrículo izquierdo, desde donde comienza otro ciclo. Según este ciclo, se conoce como **sístole** el momento de contracción de los ventrículos y expulsión de sangre por las arterias; y **diástole** el momento de relajación del corazón que coincide con el retorno de la sangre. Los movimientos de sístole y diástole del corazón también tienen su influencia en los vasos sanguíneos, especialmente en las arterias, que son los vasos que soportan la mayor carga de presión por el bombeo cardíaco. La **sangre** es un tejido líquido que contiene las células sanguíneas: eritrocitos, leucocitos y plaquetas. Los eritrocitos son células no nucleadas de pequeño tamaño que se encargan de transportar el  $O_2$ ; son las células mayoritarias de la sangre. Los leucocitos son células del sistema inmune cuya principal función es la respuesta de defensa. Las plaquetas son fragmentos de pequeño tamaño de células precursoras, encargados de la formación de trombos o coágulos para evitar la pérdida de sangre. La parte líquida no celular de la sangre se denomina plasma y también transporta otras moléculas como nutrientes, iones, etc.

### 1.1. Los vasos sanguíneos

Los vasos sanguíneos son los conductos que distribuyen la sangre. Tienen propiedades musculares y elásticas que varían dependiendo del tipo de vaso: arterias, arteriolas, venas, vénulas y capilares. La sangre sale del corazón por las arterias que se dirigen hacia los órganos del cuerpo. A medida que van alejándose del corazón las arterias van ramificándose en vasos más pequeños o arteriolas hasta llegar a formar unas redes finas denominadas capilares, lugar donde se produce el intercambio gaseoso de  $O_2$  y  $CO_2$ . Después del intercambio, los capilares se reúnen formando las vénulas y estas a su vez confluyen en las venas grandes que regresan

al corazón. De todos ellos, las arterias son los vasos más gruesos, con mayor elasticidad y capacidad contráctil, ya que reciben la sangre del corazón y están sometidas a la presión de su bombeo. Las venas son vasos de calibre grande pero de paredes delgadas, que recogen la sangre de los órganos y la devuelven al corazón. Los capilares son vasos sumamente delgados y pequeños para facilitar el intercambio de sustancias por sus finas paredes.

### 1.1.1. Arteria Aorta

La aorta es la arteria más grande del organismo. Recibe la sangre oxigenada directamente del ventrículo izquierdo y es la encargada de distribuirla mediante sus ramificaciones por todo el cuerpo. Tiene gran capacidad elástica y contráctil, ya que durante la sístole se relaja y expande en respuesta al bombeo del corazón, y en diástole se contrae, regulando así la estabilidad de la presión sanguínea sistémica. Distinguimos diferentes regiones aórticas para facilitar su estudio y comprensión (Fig. 1a):

- **Aorta ascendente (AoAsc).** Es la primera zona de la arteria con respecto al corazón y se denomina así al tramo comprendido entre la salida del ventrículo izquierdo y el inicio del cayado aórtico. En su origen en el interior del ventrículo, la arteria presenta una convexidad que da lugar a las denominadas válvulas aórticas. Después de la sístole, las válvulas se cierran como unas membranas que impiden el retorno del flujo sanguíneo al ventrículo.
- **Cayado aórtico.** Se denomina así a la continuación de la AoAsc, que tiene forma de "u" invertida, cambiando el recorrido de la sangre de una dirección ascendente a un sentido descendente.
- **Aorta descendente.** Comprende el resto de la aorta que va desde el cayado aórtico hasta las ramificaciones de las arterias ilíacas. Se distinguen dos partes:
  - **Aorta descendente torácica (AoTor).** Es el tramo de la aorta que va desde el cayado aórtico hasta el diafragma.
  - **Aorta descendente abdominal (AoAbd).** Es la parte de la aorta que discurre por el abdomen, desde el diafragma hasta las arterias ilíacas.

En condiciones fisiológicas, la AoAbd humana presenta un diámetro de aproximadamente 25mm en adultos. La AoAsc, por lo general, presenta mayor calibre que la región descendente. En ratones, en particular, el diámetro de la AoAbd en condiciones fisiológicas ronda 1mm, frente a 1,4mm en la AoAsc<sup>1</sup>.

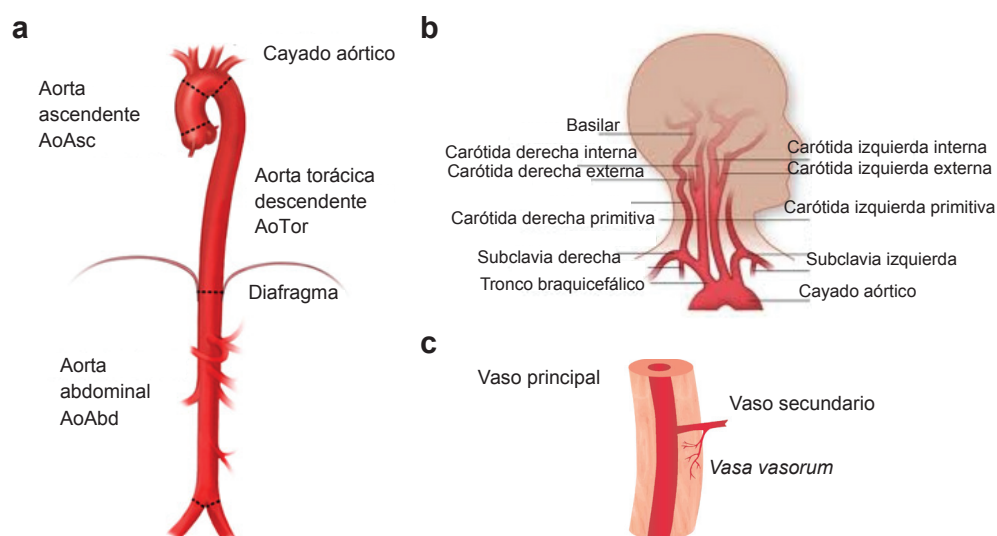
### 1.1.2. Arterias carótidas

Desde el cayado aórtico se originan tres ramificaciones: el tronco braquiocefálico, la carótida izquierda primitiva y la arteria subclavia izquierda, en orden según el recorrido de la sangre. Estas tres arterias, mediante sus posteriores ramificaciones, son las encargadas de

llevar la sangre a la cabeza (carótidas) y a las extremidades superiores (subclavias). La arteria carótida derecha es una rama del tronco braquiocefálico. La arteria carótida izquierda sin embargo nace directamente del arco aórtico (segunda ramificación), y por ello es algo más larga que su homóloga derecha. Ambas carótidas ascienden paralelas al cuello y a la altura de la cuarta vértebra cervical se bifurcan en interna y externa (Fig. 1b). Las arterias carótidas son también arterias elásticas y con capacidad contráctil debido a su proximidad al corazón y a su capacidad de distribuir la sangre a la cabeza, en el ser humano en contra de la fuerza de la gravedad.

### 1.1.3. *Vasa vasorum*

Etimológicamente del latín significa vaso de vasos. Hace referencia a una red de vasos de pequeño calibre que irriga las paredes de vasos de mayor calibre (Fig. 1c). En grandes vasos como la aorta humana, es necesario el *vasa vasorum* para distribuir oxígeno y nutrientes a las células del interior de la pared aórtica. Aunque su función en humanos es conocida, no ocurre lo mismo en animales de menor tamaño como es el ratón, donde el *vasa vasorum* aparece en determinadas situaciones patológicas como la aterosclerosis, pero su presencia en condiciones fisiológicas resulta aún controvertida<sup>2,4</sup>.



**Figura 1.** Esquema de vasos y arterias referidos en esta tesis. (a) Esquema de la arteria aorta y especificación de sus partes<sup>5</sup>. (b) Dibujo esquemático de las ramificaciones del cayado aórtico donde se encuentran, entre otras, las arterias carótidas<sup>6</sup>. (c) Dibujo esquemático de *vasa vasorum* en una arteria de gran calibre<sup>7</sup>.

## 1.2. Estructura de las arterias

La correcta estructura y anatomía de las arterias es imprescindible para el mantenimiento fisiológico del tono vascular, además de otorgar la capacidad elástica y contráctil necesaria para amortiguar los cambios de presión y flujo sanguíneo. La pared arterial está organizada en tres capas o tunicas bien diferenciadas dispuestas de manera concéntrica que garantizan la integridad y funcionalidad de los vasos: íntima, media y adventicia (Fig. 2).

## Introducción

La capa **íntima** o interna, está constituida por una monocapa de células endoteliales (CEs) estrechamente interconectadas y adheridas a la lámina basal interna. Estas células están en contacto directo con el torrente sanguíneo y funcionan como una barrera selectiva, permitiendo el paso de nutrientes, iones y otras moléculas, pero al mismo tiempo actuando como barrera de protección ante agentes externos. Esta fina capa también sirve de nexo de comunicación para la transmisión de señales o estímulos procedentes del torrente sanguíneo a la pared del vaso. Además, se encarga de la extravasación de células del sistema inmune al foco de la infección. A continuación y de forma concéntrica, se encuentra la **capa media**, delimitada por la lámina basal interna y la lámina basal externa. La capa media está compuesta principalmente por las células de músculo liso vascular (CMLVs). Entre las CMLVs existen fibras elásticas que conforman una red y contribuyen a dar mayor elasticidad a la arteria. En función del calibre de la arteria y de la presión a la que esté sometida por cercanía al corazón, la pared arterial contendrá distinto número de hileras de CMLVs y de fibras elásticas. En condiciones fisiológicas, las CMLVs tienen capacidad contráctil y son responsables del tono muscular y de la integridad del vaso<sup>8,9</sup>. Por último y de forma más externa se encuentra la **capa adventicia**, formada por una red de tejido conjuntivo compuesto principalmente por fibroblastos y colágeno, así como presencia de terminales nerviosos, poblaciones de leucocitos residentes y células progenitoras<sup>10</sup>.

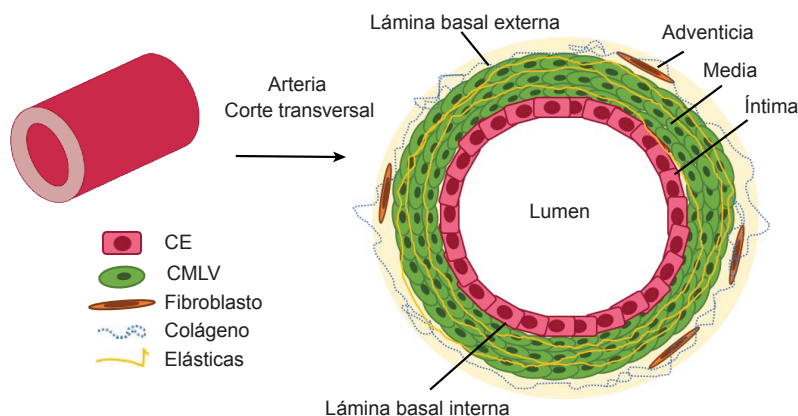


Figura 2. Dibujo esquemático de un corte transversal de una arteria donde se muestran las tres láminas que la conforman, así como las poblaciones celulares principales.

### 1.3. Fisiología del sistema cardiovascular

El mantenimiento de la estructura y anatomía del vaso es determinante para el correcto funcionamiento del sistema cardiovascular. Las CEs en la capa íntima no solo están comunicadas entre sí, sino que presentan adhesiones y sistemas de unión entre ellas que forman una barrera endotelial que contiene el torrente sanguíneo dentro del vaso<sup>11</sup>. Las CMLVs a su vez también contienen uniones y canales de comunicación e intercambio de iones

y otros factores necesarios para garantizar el trabajo sincronizado de contracción y relajación del músculo liso<sup>11-13</sup>. Existen también sistemas de comunicación entre las CEs y las CMLVs conocidas como uniones mioendoteliales (MEJ) que permiten la transmisión de señales entre las dos capas de la pared vascular<sup>14,15</sup>. Cambios en la estructura del vaso pueden eventualmente desembocar en remodelado patológico de la pared y disfunción arterial<sup>16,17</sup>.

Una de las funciones principales de los vasos sanguíneos y concretamente de las arterias es el mantenimiento de la presión arterial (PA). El corazón funciona como un motor bombeando la sangre, y la sangre a su vez circula como un fluido contenido en los vasos sanguíneos. Esto genera el efecto de la PA, que es la presión que la sangre ejerce a su paso sobre la pared de las arterias. El organismo detecta esta presión mediante la presencia de baro-receptores a lo largo del circuito vascular, y utiliza las propiedades mecano-elásticas de las arterias para regular los posibles cambios.

### **1.3.1. Regulación de la PA: sistema Renina-Angiotensina**

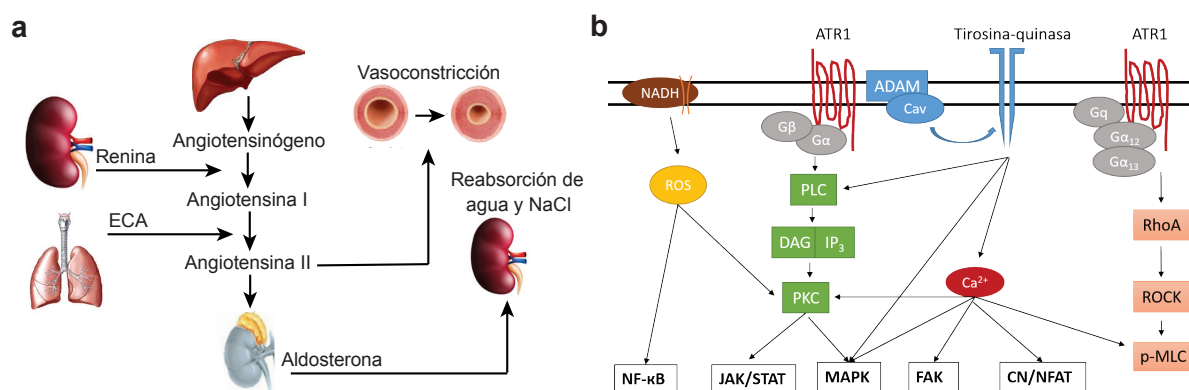
La regulación de la PA es uno de los principales campos de estudio dentro del área de investigación cardiovascular, ya que su desregulación es considerada un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. Existen diferentes factores que pueden influir en la regulación de la PA, siendo el sistema Renina-Angiotensina el principal regulador sistémico.

El sistema Renina-Angiotensina participa en el mantenimiento del balance de los electrolitos y la osmolaridad del plasma y con ello contribuye a la regulación de la PA. Cuando los baro-receptores situados en el circuito sanguíneo detectan una bajada de la presión, el sistema nervioso simpático produce una respuesta rápida de vasoconstricción. A continuación, para garantizar un efecto mantenido en el tiempo, se activa el sistema Renina-Angiotensina mediante la liberación de Renina por parte del riñón y Angiotensinógeno, por parte del hígado. La Renina es la proteasa que procesa el Angiotensinógeno para generar la Angiotensina I. A su vez la Angiotensina I es procesada por la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA) para dar lugar a la Angiotensina II (Ang-II). Ang-II es el péptido efector y actúa directamente sobre los vasos para regular la PA en condiciones fisiológicas (Fig. 3a). La Ang-II tiene efecto vasoconstrictor, aumentando la PA en situaciones de hipotensión. También tiene efecto sobre los riñones, favoreciendo la retención de sodio en los túbulos renales, contribuyendo así a una mayor reabsorción de agua y aumento de la volemia, y con ello incrementando la PA.

Mientras que la activación puntual y controlada del sistema Renina-Angiotensina es necesaria para la regulación de cambios en la PA en condiciones fisiológicas, una activación crónica o una estimulación a niveles elevados puede desencadenar patologías vasculares<sup>18</sup>. Se considera que en determinadas situaciones patológicas, las CMLVs pueden sufrir un cambio

## Introducción

de fenotipo, abandonando sus propiedades contráctiles fisiológicas para adquirir un fenotipo sintético, proliferativo y migratorio, no contráctil<sup>19,20</sup>. Otros estudios han demostrado que la Ang-II puede provocar hipertrofia del vaso<sup>21</sup>; inducir la producción de matriz extracelular, que en condiciones patológicas se puede traducir en fibrosis; pérdida de funcionalidad contráctil<sup>22,23</sup>; y aumento de la capacidad migratoria de las CMLVs<sup>24</sup>. Ang-II también puede actuar como una citoquina, activando el endotelio vascular y promoviendo el reclutamiento de células inflamatorias<sup>25</sup>. Diversos estudios atribuyen a Ang-II un papel pro-inflamatorio en el vaso, destacando su participación en el desarrollo de aneurismas y de la formación de neointima en modelos animales y en humanos<sup>26,27</sup>.



**Figura 3. Esquema del funcionamiento del Sistema Renina-Angiotensina. (a)** Funcionamiento del Sistema Renina-Angiotensina en el organismo, destacando las principales enzimas que lo forman, hasta llegar a la formación del péptido efector Angiotensina II (Ang-II). **(b)** Diagrama de algunas de las rutas de señalización activadas por Ang-II y la cascada de señalización correspondiente.

### 1.3.2. Señalización molecular mediada por Ang-II

A nivel molecular, Ang-II es reconocida y señala a través de dos subtipos de receptores acoplados a proteínas G: receptor de Angiotensina tipo I y tipo II (AT1R y AT2R, respectivamente)<sup>28</sup>. En células humanas encontramos un único receptor AT1R, mientras que en ratón el receptor AT1R presenta dos isoformas AT1a y AT1b<sup>29</sup>. El receptor AT1a, es el homólogo murino más parecido al receptor AT1R de humanos, el mejor caracterizado y el que media la mayoría de las acciones descritas de Ang-II en el sistema vascular<sup>30,31</sup>. Ambos receptores, AT1R y AT2R, juegan papeles esenciales en la regulación vascular, pero mediante acciones opuestas tanto en el sistema vascular como en el sistema renal<sup>32</sup>. Mientras que el receptor AT1a participa en el incremento de la PA (vasoconstricción)<sup>31</sup>, promueve el crecimiento celular (hipertrofia)<sup>21</sup>, la fibrosis<sup>33</sup>, y la producción de citoquinas pro-inflamatorias<sup>26</sup>; el receptor AT2R induce vasodilatación en arterias de resistencia y de conductancia y disminuye la inflamación, la fibrosis y el crecimiento celular<sup>30</sup>. En general, la señalización en los vasos sanguíneos por Ang-II es mayoritaria por su receptor AT1R, que se caracteriza por activar un gran número de rutas de señalización dando lugar así a una respuesta multifactorial y compleja (Fig. 3b). Algunas de las principales cascadas de señalización activadas se describen a continuación:

- Activación de las proteínas de señalización de receptores tirosina-quinasa Pyk2 y Src, mediante la señalización por JAK/STAT<sup>34</sup>.
- Activación de diversos miembros de la ruta de las MAPKs, resultando en la activación de sus sustratos ERK1/2, p-38 y JNK<sup>35</sup>.
- Activación de la ruta de **RhoA** y su efector **Rock**, mencionada más adelante, que tienen un papel determinante sobre la fosforilación de la cadena ligera de la miosina y, en consecuencia, sobre la contracción del músculo liso<sup>36-38</sup>.
- Activación de la fosfolipasa C (PLC), que desencadena la liberación de IP3 y DAG. Estos mediadores activan PKC y la liberación y movilización de calcio intracelular<sup>39,40</sup>. Consecuentemente, otras rutas activadas por **calcio** se verán activadas: calmodulina, FAK, y especies reactivas de oxígeno (ROS), y la ruta mediada por **Calcineurina (CN)**, entre otras<sup>41</sup>. Esta última ruta, por su implicación en procesos patológicos de remodelado cardiovascular<sup>42</sup>, se describirá con mayor detalle más adelante.

## 2. El remodelado vascular

Como hemos visto, la estructura de la pared vascular está altamente organizada para garantizar su función. Sin embargo, cualquier cambio que se produzca en esta organización puede suponer la alteración de la homeostasis de todo el sistema, conduciendo al desarrollo de enfermedades cardiovasculares. A este proceso de modificación de la anatomía vascular y desencadenamiento de patologías vasculares se le conoce como **remodelado vascular patológico**. Existe también un remodelado fisiológico que puede presentarse en determinadas situaciones como la actividad física, el embarazo o el crecimiento.

Las enfermedades cardiovasculares son la mayor causa de mortalidad en muchos países desarrollados<sup>43-45</sup>. Por lo general son enfermedades complejas donde intervienen desde factores genéticos y ambientales a otros aún desconocidos. Aunque las diferentes enfermedades tienen características especiales, a nivel vascular comparten un factor común: el remodelado de la pared vascular. Este fenómeno ocurre en respuesta a determinados estímulos, entre los que se incluyen cambios incontrolados de PA, activación de la respuesta inflamatoria, alteraciones de la matriz extracelular, aumento de lípidos en sangre o daño mecánico de los vasos. Estos estímulos desencadenan una serie de cambios en la estructura y funcionalidad de la pared vascular, que se traducen en modificaciones en el tamaño del lumen arterial y transformaciones en la capa media<sup>46</sup>, alterando la circulación normal de la sangre.

A nivel celular, la respuesta de los distintos compartimentos celulares presentes en la pared vascular a estos estímulos juega un papel determinante. Las CEs activadas pueden expresar marcadores inflamatorios, secretar citoquinas y promover la proliferación

y migración de otras células a su alrededor. Las CMLVs activadas, por su parte, pueden cambiar su fenotipo, abandonando sus propiedades contráctiles y elásticas, para adoptar un fenotipo proliferativo y migratorio. La migración y proliferación de las CMLVs puede generar patologías severas contribuyendo, por ejemplo, a la obstrucción del lumen del vaso. Otros tipos celulares de origen inmune, reclutados por las citoquinas, pueden migrar hacia la zona dañada en el vaso y producir inflamación. En algunas ocasiones, los fibroblastos procedentes de la adventicia pueden participar en el proceso como un medio de reparación, adquiriendo un fenotipo especializado conocido como miofibroblasto<sup>47,48</sup>. Esta transformación convierte los fibroblastos en células con capacidad contráctil, parecidos a las CMLVs, pero productores de matriz celular, generando fibrosis. Todos los tipos celulares tienen la capacidad de contribuir a la alteración de la matriz extracelular con producción excesiva de colágeno y de otras proteínas extracelulares, empeorando así el proceso de fibrosis y remodelado patológico<sup>17,49,50</sup>.

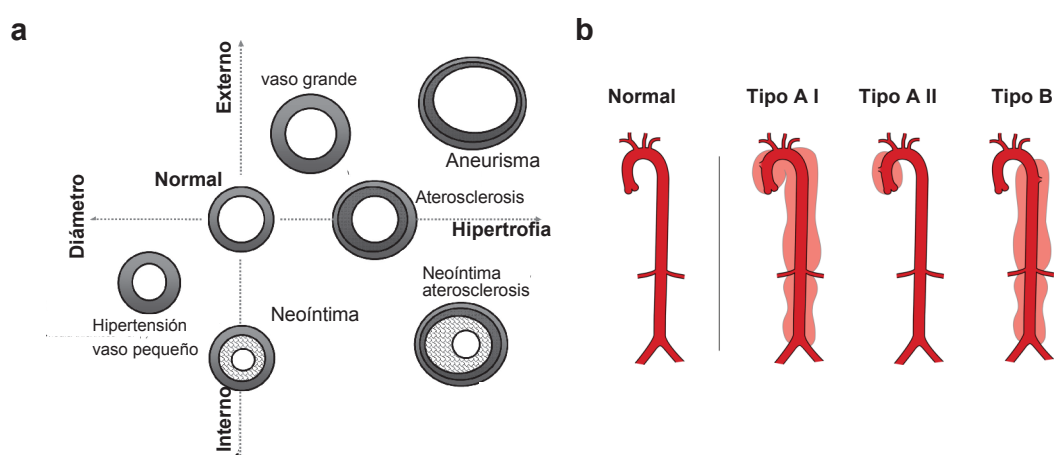
### 2.1. Clasificación del remodelado vascular patológico

Las distintas patologías que implican remodelado vascular han sido clasificadas atendiendo a diferentes criterios. Sin embargo, una de las clasificaciones más extendidas es la propuesta por Mulvany, que diferencia dos tipos principales de remodelado<sup>51,52</sup> (Fig. 4a). El primero es el remodelado **interno** (*inward*), en el cual hay un aumento de la masa vascular que afecta a la parte más interna del vaso generando una disminución del área del lumen o estenosis. Por el contrario, otros remodelados generan un aumento del diámetro **externo** (*outward*) del vaso, donde se modifican las capas más externas de la pared. Un ejemplo concreto son los aneurismas. En la mayoría de los casos podemos encontrar que el remodelado es **hipertrófico**, produciéndose un aumento de la masa de la pared vascular. Sin embargo, también existen casos de remodelado **no hipertrófico**, en el cual se mantiene la masa celular pero se modifica el diámetro, como ocurre en situaciones de hipertensión en arterias de resistencia<sup>33,52</sup>. Pese a que esta clasificación ayuda a entender de forma general las enfermedades vasculares, no tiene en cuenta otros aspectos característicos de cada enfermedad. Para ello, a continuación analizamos más en detalle algunas patologías vasculares concretas.

### 2.2. Síndrome aórtico agudo (SAA)

El Síndrome aórtico agudo (SAA) es un proceso agudo de la pared aórtica que cursa con un debilitamiento de la capa media con peligro de rotura y elevado riesgo vital. Su incidencia es de 30 casos por millón de habitantes, afectando preferentemente a hombres (60% de los casos). Está asociada a la edad y a la PA, afectando principalmente a pacientes mayores de 60 años con historial de hipertensión<sup>53</sup>. El SAA se clasifica, según los criterios de Stanford, en dos tipos diferentes en función de la región aórtica afectada: **tipo A** cuando afecta a la AoAsc

y **tipo B** cuando la AoAsc no se ve afectada<sup>54</sup>. Algunos autores subdividen el tipo A en A I, cuando afecta tanto a la AoAsc como a la descendente, y tipo A II, cuando únicamente la región ascendente está afectada (Fig. 4b)<sup>55</sup>. Por lo general, la afectación de la AoAsc tiene peor pronóstico, considerándose una emergencia quirúrgica en la mayoría de los casos y con alta tasa de mortalidad (30-40% en los primeros días). Por el contrario, los SAA de tipo B no siempre se consideran de emergencia quirúrgica, sino que se hace un seguimiento en el tiempo. Suelen tener mejor pronóstico en los primeros días con tasas de mortalidad del 10%, pero si se dan complicaciones, la mortalidad puede ascender al 30% en los primeros 30 días<sup>54,56,57</sup>. Existen tres tipos de patologías consideradas SAA que presentan las mismas manifestaciones clínicas, pero diferente etiopatogenia y que, en ocasiones, requieren diferente tratamiento (Fig. 5).



**Figura 4. Clasificación de patologías aórticas. (a)** Clasificación de Mulvaney<sup>56</sup>. **(b)** Clasificación de Stanford<sup>57</sup> aplicable a Das y HIMs.

### 2.2.1. Disección aórtica (DA)

La DA ocurre cuando la pared arterial se degrada o rompe en un determinado punto permitiendo el paso de la sangre desde el lumen hacia la capa media de la aorta (Fig. 5b)<sup>54,55,59</sup>. Con el tiempo y sumado a la PA y al bombeo de la sangre, la rotura se puede ir extendiendo por la capa media llegando a generar un segundo lumen con circulación paralela, llamado falso lumen. Con el transcurso de la enfermedad la pared aórtica va sufriendo degradación hasta poder llegar a romperse por completo con riesgo de muerte por hemorragia interna. Es la más común de los SAA, englobando un 80% de todos los casos. Para su diagnóstico se requiere técnicas de imagen avanzada, siendo la técnica de elección la tomografía axial computerizada, muchas veces en combinación con la ecografía transesofágica o con la resonancia magnética nuclear<sup>55</sup>.

### 2.2.2. Úlcera aterosclerótica penetrante (UAP)

La úlcera aterosclerótica penetrante (UAP) es una evolución de una placa de ateroma, que cursa con ulceración y degradación severa de la pared de la aorta, llevando a posible rotura de la pared y la generación de una DA. Está asociada a enfermedad aterosclerótica avanzada y a hipertensión, con gran alteración de la estructura de la media y de la matriz extracelular. La UAP es la entidad menos prevalente entre los SAA (10%)<sup>55</sup>.

### 2.2.3. Hematoma Intramural (HIM)

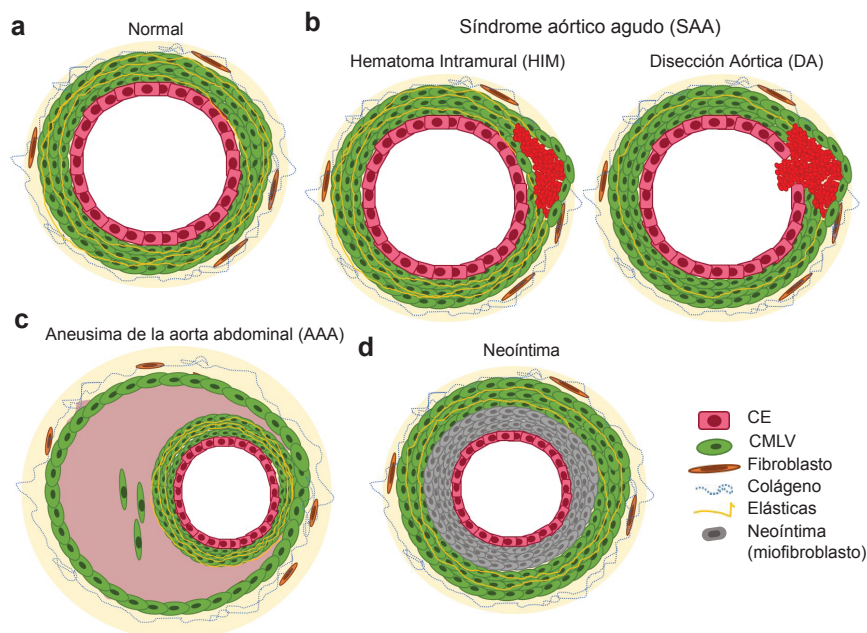
El HIM se caracteriza, igual que los anteriores SAA, por la presencia de sangre en la capa media de la pared aórtica (Fig. 5b). Sin embargo, a diferencia de las DA y UAP, el HIM no presenta aparente rotura de la capa íntima de la arteria, sino únicamente una hemorragia contenida en la pared del vaso. De hecho, en los HIM no se observa un falso lumen ni circulación paralela de la sangre, sino una bolsa de sangre retenida sin flujo aparente. El HIM tiene un pronóstico más favorable que la DA, aunque la gravedad y el tratamiento dependen igualmente de la localización de la lesión. La evolución de los HIM es muy variable, siendo reabsorbidos en algunos casos sin mayor complicación. En otras ocasiones, el HIM puede evolucionar hacia la rotura de la pared arterial generando una DA. En otros casos, pueden cronificar con complicaciones graves hacia la formación de aneurismas aórticos<sup>60</sup>. En general, se considera que 15-20% de los pacientes con HIM muere por rotura aórtica en los primeros 5 años<sup>53,56,57,61</sup>.

El protocolo de diagnóstico de HIM sigue el proceso normal para los SAA, siendo el HIM el más difícil de detectar. La tomografía axial computerizada sin contraste en ocasiones no lo detecta o genera dudas sobre la existencia de la patología. Esta misma técnica con contraste mejora el diagnóstico, aunque no siempre es la técnica de primera elección. La ecografía transesofágica es útil para la detección cuando el HIM se localiza en la región torácica. Ante dudas persistentes se utiliza la resonancia magnética que aporta mayor resolución<sup>62,63</sup>. Aunque el HIM está fuertemente asociado a la edad avanzada y a la hipertensión, se desconoce la etiología de la enfermedad. Concretamente el origen de la sangre contenida en la capa media de la pared es una cuestión aún desconocida. La hipótesis más generalizada apunta al *vasa vasorum* como el origen de la hemorragia encontrada en la media, ante ausencia de rotura de la capa íntima<sup>53,64</sup>. La hemorragia encontrada en la capa media va acompañada de la pérdida de CMLVs, de desorganización de la estructura de la pared vascular y de rotura de las láminas elásticas.

### 2.3. Aneurisma aórtico

El aneurisma es una dilatación localizada de la pared arterial que va acompañada de degeneración de la pared vascular, desorganización de la estructura y riesgo de rotura. El remodelado del vaso es hipertrófico, ya que suele ir acompañado de proliferación y aumento de la masa celular que se produce hacia el exterior del vaso. Esto genera un aumento del diámetro total del vaso, que en muchas ocasiones sufre también una reducción del lumen. El tabaco, la hipertensión, la edad, las lesiones ateroscleróticas avanzadas o la predisposición genética (como es el caso de los pacientes con síndrome de Marfan<sup>65,66</sup>) son factores de riesgo para el desarrollo de aneurismas. Las arterias más susceptibles de sufrir aneurismas son las arterias cerebrales y la aorta tanto ascendente como descendente<sup>67</sup>. Los aneurismas de la aorta abdominal (AAA) humanos se desarrollan principalmente en la zona infra-renal cerca de las arterias ilíacas<sup>68</sup>. Sin embargo, la porción abdominal más susceptible de sufrir la enfermedad en ratones es la suprarrenal<sup>69-71</sup>.

A nivel estructural, los aneurismas se caracterizan por una desorganización de la estructura de la pared vascular. La migración y proliferación de células en la túnica media generan ese engrosamiento progresivo del diámetro del vaso. Además, puede observarse un exceso de matriz extracelular (Fig. 5c). En ocasiones, puede existir infiltrado inflamatorio, que a su vez contribuye a la activación del endotelio y del músculo liso vascular<sup>72</sup>. Todo esto contribuye a que la degeneración de la pared aórtica vaya progresando hasta debilitarla tanto que sea susceptible de rotura y/o formación de trombo<sup>70</sup>.



**Figura 5. Esquemas representativos de patologías aórticas.** (a) Aorta en condiciones fisiológicas. (b) Síndromes aórticos agudos (SAAs), con representación del hematoma intramural (HIM) y la disección aórtica (DA) como ejemplos. (c) Esquema de un aneurisma de la aorta abdominal (AAA). (d) Dibujo esquemático de una arteria con formación de neoíntima.

### 2.4. Formación de neoíntima

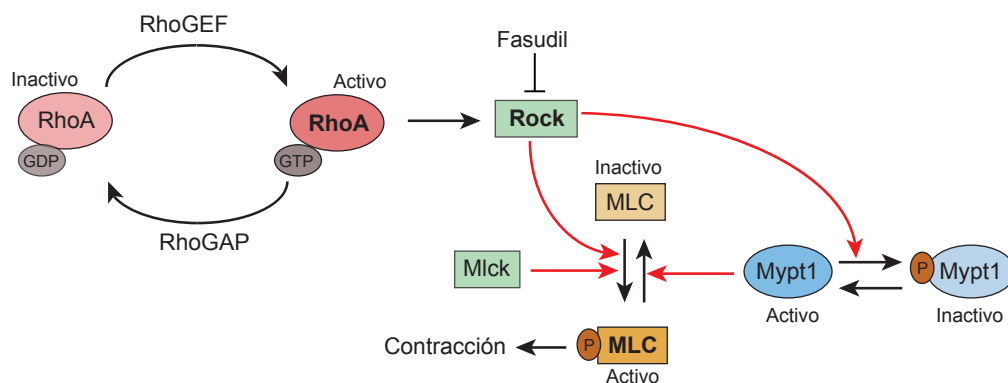
La formación de neoíntima o estenosis es el remodelado del vaso que conduce a una reducción del lumen arterial por una hiperplasia interna (Fig. 5d). A nivel celular, estos sucesos se caracterizan por un aumento notable de presencia de miofibroblastos que conducen a la reducción de la luz<sup>73</sup>. En arterias de pequeño calibre, como son las arterias coronarias que irrigan al corazón, el estrechamiento o taponamiento del lumen arterial (estenosis) producido por la aterosclerosis, por ejemplo, puede conducir a una falta de riego y riesgo de infarto. En ocasiones, para evitar este suceso, se interviene al paciente mediante angioplastia para reabrir la arteria y colocar un *stent* para mantenerla abierta. Sin embargo, posterior a la intervención puede producirse una recurrencia de la estenosis como consecuencia de la actividad mecánica de la cirugía, a la que se le denomina restenosis<sup>74,75</sup>. En roedores se utilizan modelos para inducir la formación de neoíntima, normalmente basados en la activación del endotelio por daño mecánico. Por ejemplo, la ligación de la arteria carótida genera cambios hemodinámicos que conducen a la formación de neoíntima y obstrucción del lumen<sup>76</sup>.

### 2.5. Mecanismos moleculares de remodelado vascular

El remodelado vascular es un proceso complejo en el cual intervienen muchos mecanismos y rutas de señalización a la vez. La desregulación de la síntesis de óxido nítrico (NO) puede participar en procesos de remodelado, ya que el NO juega un papel importante en el estado oxidativo del vaso, participando en procesos de contracción y relajación arterial<sup>65</sup>. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) presentes en casos de isquemia, son el resultado de situaciones de hipoxia y contribuyen a la muerte celular y degeneración del tejido<sup>77</sup>. Por otro lado, la señalización a través de TGF $\beta$  y SMAD2 puede promover la diferenciación de las CMLVs con activación de la expresión de proteínas de carácter contráctil como la actina de músculo liso. Sin embargo, una activación excesiva de la ruta de TGF $\beta$  también produce un aumento de la proliferación de las CMLVs y un exceso de producción de matriz extracelular y fibrosis. Además, la activación por TGF $\beta$  contribuye al aumento de la respuesta inflamatoria en las patologías de remodelado vascular<sup>78,79</sup>. Otro mecanismo bien conocido implicado en el remodelado del vaso es la activación de la familia de metaloproteinasas de matriz (MMPs). Las MMPs son enzimas que cortan, procesan y degradan proteínas de la matriz extracelular. La alteración de su actividad puede cambiar la estructura de la pared del vaso. Concretamente, la activación de MMP2 y MMP9 se relaciona con casos de patología vascular<sup>65,80</sup>. Factores de crecimiento como PDGF o FGF también inducen la proliferación descontrolada de las CMLVs. Rutas de señalización como las MAPK podrían también estar implicadas en patologías vasculares como los aneurismas aórticos<sup>81</sup>. Otras rutas de señalización, como las mediadas por Calcineurina o RhoA, se ven desreguladas en muchos casos de daño vascular<sup>27,82</sup>.

### 2.5.1. Ruta de señalización de RhoA

La subfamilia Rho de proteínas GTPasas pequeñas pertenece a la superfamilia de Ras. Sus miembros mejor caracterizados son: RhoA, Rac1 y Cdc42<sup>83</sup>. Las proteínas Rho modulan su actividad mediante su asociación con GTP (estado activado) o GDP (estado inactivado), de manera que proteínas promotoras de la unión a GTP (RhoGEFs) son activadores, y proteínas responsables de la conversión a GDP (RhoGAPs) son inhibidores<sup>84</sup> (Fig. 6). En general, se ha asociado la actividad de los miembros de Rho con la conformación celular, organización del citoesqueleto, regulación del movimiento celular y otras funciones celulares. Más concretamente, Rac1 parece imprescindible en la formación de lamelipodios, Cdc42 en la formación de filopodios y RhoA parece responsable de la formación de fibras de estrés<sup>83</sup>. Así, la activación de RhoA resulta de gran interés por estar asociada a la contracción celular. Concretamente, RhoA activa a la quinasa asociada a RhoA (Rock), quien a su vez fosforila e inactiva a su proteína diana principal, la fosfatasa de la cadena ligera de miosina (Mypt1). Dado que la fosforilación de la cadena ligera de la miosina (MLC; p-MLC en su estado fosforilado) promueve la asociación de actina y miosina y, por tanto, la contracción muscular, un aumento de la fosforilación de Mypt1 mediada por Rock favorece la contracción celular al activar la fosforilación de MLC (Fig. 6). MLC también puede ser activada mediante su fosforilación por otras quinasas, como la quinasa de la cadena ligera de miosina (Mlck), entre otras<sup>84,85</sup>. Alteraciones en la ruta de señalización de RhoA han sido relacionadas con disfunciones en el sistema nervioso y desórdenes inmunológicos<sup>86-88</sup>. La desregulación de MLC afecta a la capacidad contráctil del vaso y, por consiguiente, a su correcta funcionalidad. En este sentido, sustratos activados por Rock han sido propuestos como mediadores de patologías vasculares como la aterosclerosis o la hipertensión<sup>89</sup>. También se ha sugerido un papel para RhoA como activador de la permeabilidad vascular<sup>90</sup>.



**Figura 6. Ruta de señalización de RhoA/Rock y activación de MLC.** La inducción de p-MLC puede ser mediada directamente por quinasas como Mlck o Rock y desfosforilada por la fosfatasa Mypt1. La actividad de Rock y Mypt1 están a su vez reguladas por RhoA.

### 2.5.2. Ruta de señalización de Calcineurina

Calcineurina (CN), también llamada serina-treonina proteína fosfatasa 2B, es una enzima fosfatasa dependiente de calcio. Está formada por dos componentes: Calcineurina A (CnA) o subunidad catalítica y Calcineurina B (CnB) o subunidad reguladora. Sus sustratos mejor caracterizados son los miembros de la familia de los factores nucleares de células T activadas (NFAT), quienes son activados por CN mediante su desfosforilación<sup>91</sup>. Algunos de los genes regulados por los factores NFAT incluyen citoquinas inflamatorias<sup>92</sup>, la Ciclooxygenasa 2 (COX2)<sup>93,94</sup> o el Regulador de Calcineurina 1 (RCAN1)<sup>95,96</sup>. Se ha demostrado que CN actúa como activador de ciertas patologías cardiovasculares, incluyendo hipertrofia cardíaca, AAA y formación de neoíntima<sup>82,97</sup>. La inhibición farmacológica de CN mediante ciclosporina A (CsA) o la delección del gen, protegen frente al desarrollo de estas patologías<sup>82</sup>. Inhibidores de CN como CsA y FK506 se usan en clínica como inmunosupresores. Algunos inhibidores endógenos de CN son: Cabin1<sup>98,99</sup>, AKAP79<sup>100-102</sup> o **RCAN**<sup>99</sup>.

## 3. Regulador de Calcineurina 1: RCAN1

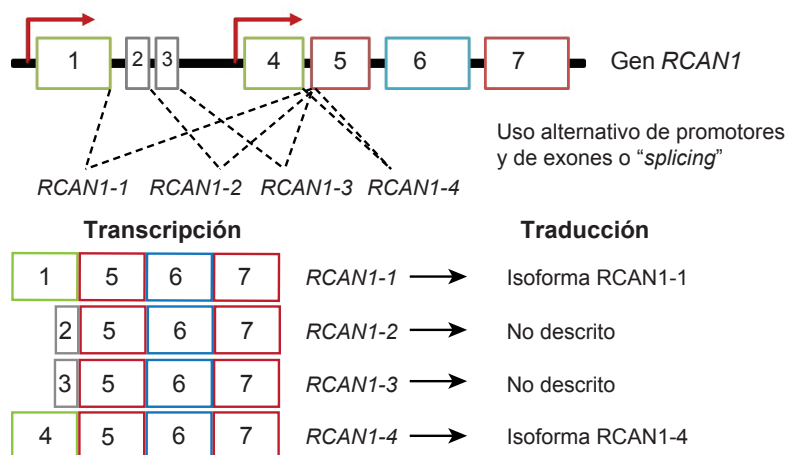
### 3.1. Familia de proteínas RCAN

RCAN1 es miembro de la familia de proteínas RCAN o Regulador de Calcineurina. Los miembros de esta familia están bien conservados en eucariotas<sup>103,104</sup>. En concreto, el gen *RCAN1* humano guarda un 96% de homología con su homólogo murino. La familia de RCAN la componen las proteínas codificadas por tres genes diferentes en vertebrados: *RCAN1*, *RCAN2* y *RCAN3*; mientras que en invertebrados, hongos y protozoos existe un único miembro: *RCN1*<sup>105,106</sup>. La familia RCAN fue descrita por primera vez en un estudio comparativo de genes conservados entre los genomas de humano y levadura<sup>107</sup>. Los miembros de la familia de RCAN tienen en común un dominio consenso LxxPxxxKxFLISPPxSPPxxW, donde la secuencia FLISPP es susceptible de fosforilación por proteínas quinasas. Además, el motivo LxxP coincide con el péptido LxVP de unión a CN, presente también en los miembros de la familia NFAT y con capacidad para inhibir la actividad CN<sup>99,108,109</sup>. La secuencia PSVVVH es similar al sitio PxxIT de NFAT y es necesaria para la unión a CN<sup>99,105,110</sup>. Así, parece que RCAN podría regular CN mediante dos mecanismos de actuación: competición por la interacción con otros sustratos de CN y regulación de la actividad fosfatasa. En concreto el miembro RCAN1 es capaz de interactuar con la región catalítica de CN<sup>99</sup>. Aunque existe cierta controversia sobre la función de RCAN1, es aceptado que puede inhibir la actividad de CN. Pero otros autores también le atribuyen, como se comentará más adelante, un papel activador de CN.

### 3.2. Rcan1

#### 3.2.1. Regulación transcripcional de Rcan1

RCAN1 es el miembro mejor descrito de la familia de RCAN. También se le conoce como Calcipresina 1, MCIP1, ADAPT78 o DSCR1<sup>111</sup>. La expresión de *RCAN1* se ha detectado en varios tejidos en edad adulta, siendo especialmente abundante en el cerebro, en músculo liso, músculo esquelético y en el corazón. Durante el desarrollo embrionario se expresa principalmente en el sistema nervioso, lo que sugiere que podría desempeñar un papel importante en el desarrollo de este órgano<sup>112,113</sup>. El gen *RCAN1* contiene 7 exones y su transcripción se regula por uso alternativo de promotores y exones (Fig. 7). De esta manera da lugar al menos a cuatro transcritos conocidos diferentes: *RCAN1-1*, *RCAN1-2*, *RCAN1-3* y *RCAN1-4*. De los cuatro, solo dos de ellos son traducidos a proteína, dando lugar a las dos isoformas de RCAN1: RCAN1-1 y RCAN1-4. Las dos isoformas son reguladas por promotores independientes y difieren en su primer exón. De esta manera, *RCAN1-1* está codificada por los exones 1, 5, 6 y 7 y regulada por un promotor en la secuencia 5' al exón 1. Por otro lado, *RCAN1-4* está codificada por los exones 4, 5, 6 y 7 y su promotor se sitúa en el intrón 3 del gen (Fig. 7)<sup>42,107</sup>. Las dos isoformas presentan patrones de expresión diferentes, de manera que *RCAN1-1* se expresa normalmente de forma constitutiva en diversos tejidos, mientras que *RCAN1-4* apenas se expresa en condiciones basales y su expresión se induce *de novo* por distintos estímulos, incluyendo los movilizadores de calcio intracelular y activadores de la ruta CN/NFAT<sup>107,114</sup>. El promotor de *RCAN1-4* está mejor caracterizado que el de *RCAN1-1*, y se sabe que contiene al menos 15 sitios de unión a NFAT<sup>115,116</sup>. Esto convierte a RCAN1-4 en una de las principales moléculas inducidas por la activación de la ruta CN/NFAT en CMLVs<sup>82</sup>. También se ha descrito que el factor de transcripción C/EBPβ puede inducir *RCAN1-4*.



**Figura 7. Esquema del gen RCAN1.** La transcripción de *RCAN1* se produce por uso de promotores (flechas rojas) y de exones (cajas y líneas discontinuas) alternativo, dando lugar a 4 transcritos: *RCAN1-1*, *RCAN1-2*, *RCAN1-3* y *RCAN1-4*. La traducción de estos transcritos da lugar a las isoformas RCAN1-1 y RCAN1-4.

4 independientemente de la ruta de CN<sup>117</sup>.

### 3.2.2. Regulación post-traducciona de Rcan1

Diversos estudios bioquímicos sugieren que RCAN1 es diana de modificaciones post-traduccionales como son la fosforilación y la ubiquitinación, de las cuales puede depender su función y efecto sobre CN/NFAT. En este sentido, se ha descrito que RCAN1 puede ser fosforilada por parte de GSK-3  $\beta$ <sup>118</sup>, TAK1<sup>119</sup> o BMK-1<sup>120</sup>. Según estos estudios, la fosforilación de RCAN1 la convierte en un activador de la ruta de CN. Por otro lado, la fosforilación de su región C-terminal por la quinasa inductora de NF- $\kappa$ B (NIK) aumenta su estabilidad y el efecto inhibitor que RCAN1 ejerce sobre CN<sup>121,122,123</sup>. Asimismo, también ha sido descrita la ubiquitinación de RCAN1-1, haciéndola susceptible de degradación por parte del proteasoma. La eliminación de RCAN1-1 permitiría amplificar la señalización de NFAT<sup>124</sup>, atribuyendo en este caso a RCAN1 un papel como inhibidor de CN. Aunque la regulación post-traducciona de RCAN1 podría servir como mecanismo potencial para explicar la regulación diferencial que ejerce sobre CN, serían necesarios estudios adicionales que clarificaran el papel dual de RCAN1.

### 3.2.3. Implicaciones de Rcan1 en patologías

RCAN1, también llamado *DSCR1* (*Down Syndrome Critical Region 1*) fue descrito inicialmente como un gen asociado al Síndrome de Down, ya que se encuentra situado en la región crítica de trisomía del cromosoma 21 causante de dicho síndrome<sup>111</sup>. En el caso de ratones, *Rcan1* se localiza en el cromosoma 16. En un modelo de ratón modificado genéticamente (ratón Ts65Dn) también se ha observado que su trisomía presenta un desequilibrio de dosis génica con un fenotipo similar al observado en humanos<sup>125,126</sup>. Además, en patologías humanas se ha observado un aumento de expresión de *RCAN1* en el cerebro de pacientes con enfermedad de Alzheimer<sup>127,128</sup>. En células neuronales en cultivo, la estimulación con proteína  $\beta$ -amiloide, proteína fuertemente asociada al Alzheimer, induce la expresión de *Rcan1*, al mismo tiempo que activa Gsk-3  $\beta$  y la fosforilación de su sustrato Tau<sup>127-130</sup>. Estudios en ratones han mostrado que la desregulación de la expresión de *Rcan1* afecta al comportamiento y a la memoria de forma similar a los pacientes de síndrome de Down o de Alzheimer<sup>125,131,132</sup>. También se ha visto que ratones que sobre-expresan RCAN1 presentan menor capacidad de aprendizaje, efecto que se ha asociado también a la inhibición de la actividad CN<sup>133-136</sup>. El papel de RCAN1 también ha sido investigado en estudios de cáncer y angiogénesis. La sobre-expresión de RCAN1 en ratones inhibe la actividad CN y protege del crecimiento tumoral<sup>137,138</sup>, lo que sugiere que RCAN1 puede actuar como un supresor de tumores. Los estudios de RCAN1 en angiogénesis parecen ser algo más contradictorios. Por un lado, varios autores coinciden en que RCAN1 puede contribuir negativamente a la formación de nuevos vasos, ya que mediante

su sobre-expresión se inhibe la angiogénesis<sup>95</sup>. Sin embargo, otros estudios atribuyen a Rcan1 un papel mediador de la migración de CEs y facilitador de la angiogénesis, al observar que el silenciamiento de *Rcan1* inhibe la migración endotelial y la angiogénesis<sup>139,140</sup>. En el contexto inflamatorio, se han sugerido alternativamente papeles como regulador positivo y negativo para Rcan1. Se ha demostrado que Rcan1 desempeña un papel esencial en la producción y maduración de eosinófilos<sup>141,142</sup>. Por otro lado, animales deficientes en *Rcan1* presentan más apoptosis de células T<sup>143,144</sup>. Estudios posteriores sobre la respuesta innata mostraron que la deficiencia de *Rcan1* aumentaba la producción de citoquinas inflamatorias en respuesta a diferentes estímulos inmunológicos<sup>145</sup>, aumentando la mortalidad en modelos de infección respiratoria<sup>146</sup>.

En cuanto al papel de Rcan1 en patologías cardiovasculares existe cierta controversia. En modelos de infarto de miocardio se ha observado que la sobre-expresión de RCAN1 otorgaba un papel protector<sup>147</sup>. La sobre-expresión de RCAN1 también confería protección frente al desarrollo de la hipertrofia cardíaca inducida por estimulación  $\beta$ -adrenérgica, ejercicio o sobre-expresión de CN en cardiomiocitos (ratones  $\alpha$ -MHC-CnA)<sup>148-150</sup>. En concordancia con estos datos, la delección de *Rcan1* en el modelo genético de  $\alpha$ -MHC-CnA exacerba la hipertrofia y empeora la fibrosis<sup>151,152</sup>. Sin embargo, cuando la hipertrofia era inducida por estimulación crónica de receptores  $\beta$ -adrenérgicos o por constricción aórtica, la ausencia de *Rcan1* reducía el desarrollo de hipertrofia<sup>144,153</sup>. Por lo tanto, se sugería que Rcan1 podía jugar, no solo roles diferentes en la regulación de CN, sino también papeles duales en hipertrofia cardíaca potenciándola o inhibiéndola, dependiendo del estímulo hipertrófico utilizado<sup>151,154</sup>. Por último, Rcan1 ha sido también estudiado en diversas patologías de remodelado vascular, donde se ha puesto de manifiesto su papel como mediador del remodelado patológico del vaso. En concreto, animales deficientes en Rcan1 mostraban protección frente al desarrollo de patologías vasculares como la aterosclerosis<sup>155</sup>, la formación de neoíntima y los AAA<sup>82</sup>. El efecto protector se observaba también en el modelo de aterosclerosis al trasplantar en ratones silvestres irradiados la médula ósea de ratones deficientes, sugiriendo un papel importante del sistema hematopoyético en esta patología<sup>155</sup>. La Tabla 1 muestra un resumen de los distintos modelos de patologías cardiovasculares reportados con el papel que juega Rcan1 en cada uno de ellos.

Si bien se han descrito implicaciones de Rcan1 en diferentes procesos fisiológicos y patológicos, existe poca información concluyente sobre los mecanismos moleculares en los que participa en cada caso. Estudios hasta la fecha han demostrado que RCAN1 puede interactuar con la subunidad catalítica de CN y regular su actividad<sup>99,109</sup>. Aunque la mayoría de los autores atribuyen a RCAN1 un papel inhibidor de CN, existen otros datos que indican que RCAN1 puede facilitar su actividad. Es posible que, como ya se había sugerido anteriormente, la

## Introducción

función de RCAN1 depende del contexto, tipo celular, niveles de expresión y modificaciones post-traduccionales, entre otros factores. También se han explorado funciones de RCAN1 no relacionadas con sus efectos sobre CN. De hecho, se ha mostrado que Rcan1 puede interactuar con I $\kappa$ B $\alpha$  y aumentar sus niveles de expresión, inhibiendo así la ruta de NF- $\kappa$ B<sup>156</sup>. También se ha propuesto que RCAN1 podría inhibir la formación y liberación de vesículas<sup>157,158</sup>. Así, en células neuroendocrinas la desregulación de la exocitosis estaría relacionada con la secreción de neurotransmisores y, en consecuencia, con patologías neurológicas. Otros estudios también implican a RCAN1 en la inhibición del crecimiento celular, ya que la disminución de RCAN1 conduce a una reducción de los niveles de Ras<sup>159</sup>.

Patología	Modelo patológico	Animal	Rcan1	Referencia
Infarto de miocardio	Isquemia-reperfusión	$\alpha$ MHC-Rcan1-4	Protector	van Rooij et al 2004 <sup>145</sup>
Hipertrofia cardíaca	Activación constitutiva de CN	$\alpha$ MHC-Rcan1-4	Protector	Rothermel et al 2001 <sup>146</sup>
Hipertrofia cardíaca	Activación constitutiva de CN	Rcan1 <sup>-/-</sup>	Protector	Vega et al 2002 <sup>151</sup>
Hipertrofia cardíaca	Estimulación $\beta$ -adrenérgica	Rcan1 <sup>-/-</sup>	Mediador	Vega et al 2002 <sup>151</sup>
Hipertrofia cardíaca	Hipertensión	Rcan1 <sup>-/-</sup>	Mediador	Vega et al 2002 <sup>151</sup>
AAA	ApoE <sup>-/-</sup> + AngII	Rcan1 <sup>-/-</sup>	Mediador	Esteban et al 2011 <sup>80</sup>
Neointima	Daño femoral	Rcan1 <sup>-/-</sup>	Mediador	Esteban et al 2011 <sup>80</sup>
Aterosclerosis	ApoE <sup>-/-</sup> + Dieta grasa	Rcan1 <sup>-/-</sup>	Mediador	Mendez-Barbero et al 2013 <sup>153</sup>

Tabla 1. Papel atribuido a Rcan1 en distintos modelos de patología cardiovascular.

A pesar de la importancia que Rcan1 parece tener en procesos de remodelado vascular, la información descrita acerca de los mecanismos moleculares en los que participa es escasa. Además, pocos son los trabajos que han abordado el estudio de las isoformas de Rcan1 por separado, y cuando lo han hecho ha sido mediante sistemas de sobre-expresión que no reflejan los niveles de expresión fisiológicos. Asimismo, existen distintos tipos celulares implicados en los procesos de remodelado vascular, y la contribución de Rcan1 en cada uno de ellos permanece a día de hoy inexplorada.

# Objetivos





Rcan1 había sido descrito anteriormente como un mediador del remodelado vascular patológico, ya que su ausencia protegía frente al desarrollo de aneurismas, la formación de neoíntima y la aterosclerosis. Sin embargo, los procesos celulares y moleculares que mediaban este papel eran desconocidos, no existía información del papel que Rcan1 desempeñaba en cada tipo celular presente en la pared del vaso y se desconocía la contribución que las dos isoformas de Rcan1 pudieran tener en procesos fisiológicos y patológicos del vaso.

El objetivo principal de esta tesis ha sido estudiar la contribución de las diferentes isoformas de Rcan1, en cada uno de los tipos celulares presentes en la pared del vaso, a procesos patológicos de remodelado vascular, así como identificar los mecanismos moleculares implicados. Para ello hemos abordado los siguientes objetivos concretos:

- Estudiar la contribución de Rcan1 a procesos de remodelado vascular patológico en los compartimentos celulares vasculares principales: músculo liso vascular y endotelio. Los modelos explorados incluyen HIMs, AAA y formación de neoíntima.
- Determinar la contribución específica de las isoformas Rcan1-1 y Rcan1-4 a los procesos de remodelado vascular en HIMs, AAA y formación de neoíntima.
- Investigar los mecanismos moleculares implicados en la regulación del remodelado vascular patológico por Rcan1. Estudiar posibles papeles diferenciales por isoforma o por compartimento celular.



# Materiales y Métodos



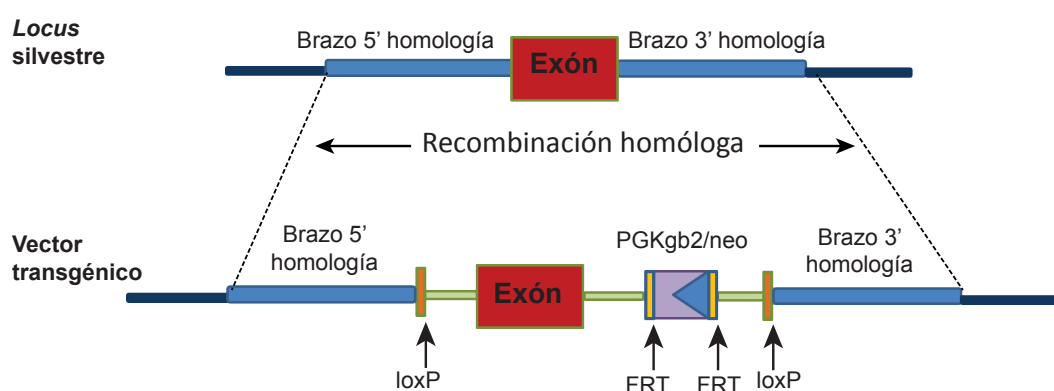


## 1. Animales

Todos los ratones se mantuvieron en las instalaciones del CNIC en un ambiente controlado de patógenos, con ciclos de luz y oscuridad, temperatura y humedad regulados según la normativa europea para el cuidado animal (Directiva UE 2010/63EU y Recomendación 2007/526/EC).

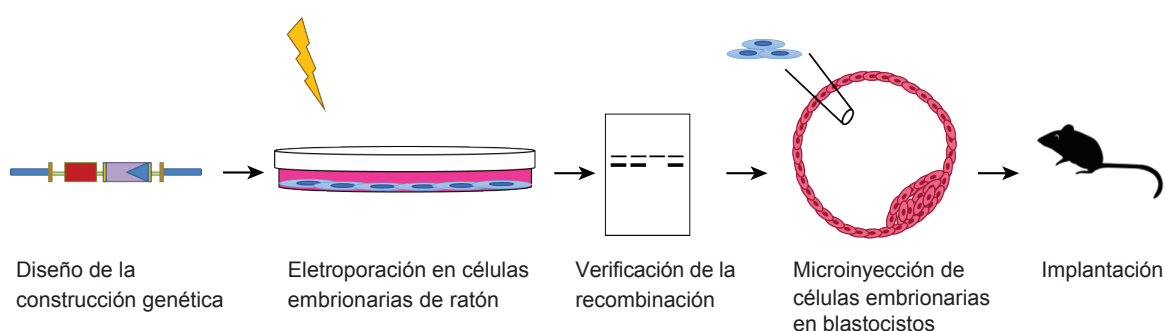
Los animales *Rcan1*<sup>-/-</sup> utilizados fueron descritos anteriormente<sup>160,161</sup>. En ellos, la expresión de *Rcan1-1* y *Rcan1-4* está bloqueada de forma constitutiva por medio de la delección del exón 6, común a ambas isoformas.

Los ratones transgénicos fueron generados usando métodos descritos anteriormente<sup>162-165</sup>. Las construcciones genéticas de los vectores de recombinación fueron diseñadas para la recombinación homóloga específica en el *locus Rcan1* mürido, según el esquema mostrado en la Figura 8. Se escogieron regiones específicas de cada isoforma para llevar a cabo la modificación del gen y conseguir ratones específicos de isoforma. De este modo, se realizaron construcciones para flanquear con sitios loxP el exón 1, específico de *Rcan1-1*; exón 4, específico de *Rcan1-4*; y el exón 6 común a ambas isoformas. Para el diseño se evitó la modificación de promotores o regiones reguladoras ya descritas o regiones con predicción de ser potencialmente reguladoras. A ambos lados del exón diana se insertaron brazos de homología de aproximadamente 6 kb y sitios loxP de reconocimiento por la recombinasa Cre<sup>166</sup>. Entre el exón diana y el sitio loxP ubicado en su zona 3' se introdujo un casete PGKgb2/neo flanqueado por sitios FRT de reconocimiento por la recombinasa FLP (Fig. 8). El casete PGKgb2/neo codifica una proteína que proporciona resistencia a neomicina y permite la selección de los recombinantes positivos.



**Figura 8.** Esquema del *locus silvestre Rcan1* y el vector transgénico diseñado para introducirse por recombinación homóloga. El vector transgénico contiene el exón diana de *Rcan1* (exones 1, 4 o 6) flanqueado con sitios loxP, que a su vez flanquean un casete de resistencia a Neomicina flanqueado con sitios FRT; la construcción está flanqueada por dos brazos homólogos al *locus silvestre* de 6 kb de longitud.

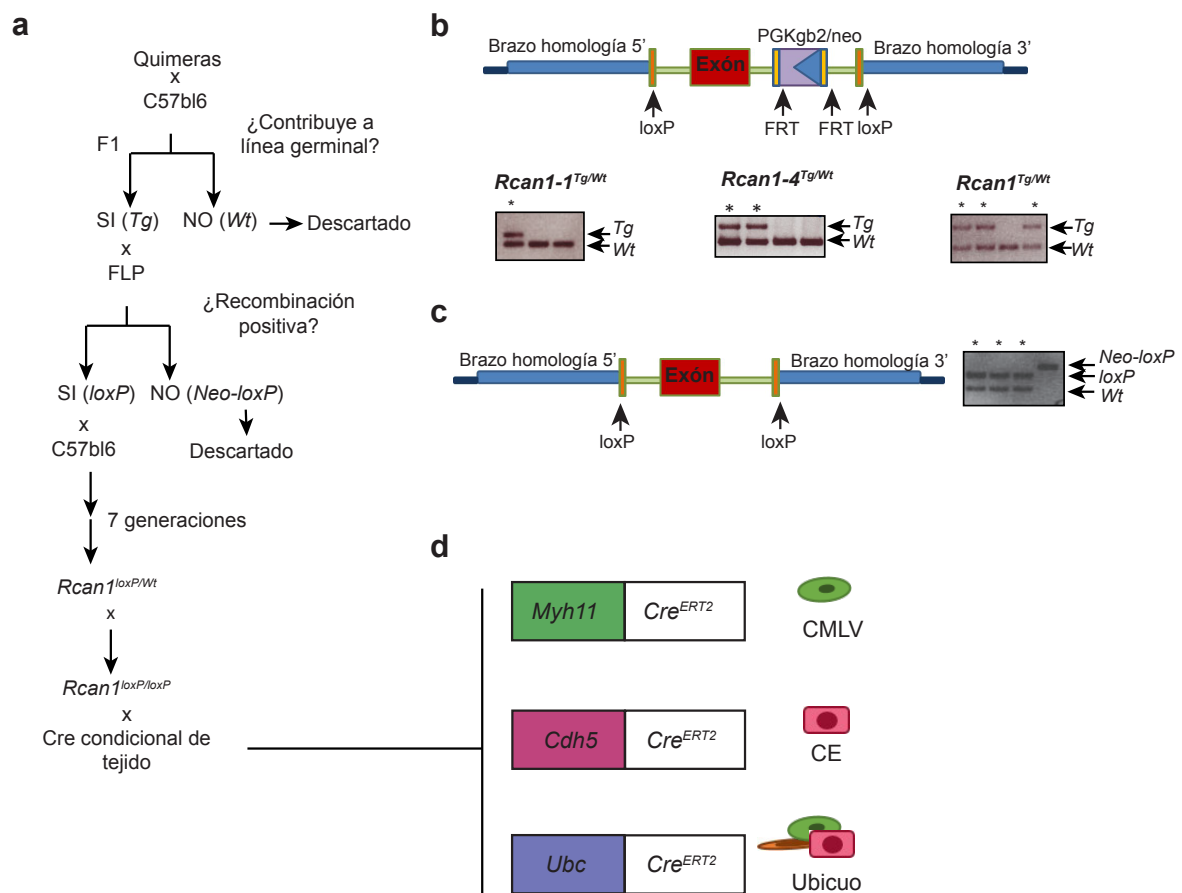
Estas construcciones se diseñaron y se clonaron en un vector BAC. La construcción genética se introdujo en células embrionarias troncales de ratón mediante electroporación, y posteriormente se mantuvieron con medio de cultivo selectivo (neomicina). La recombinación homóloga fue comprobada mediante *southern blot* en ambos extremos 5' y 3' para descartar inserciones aleatorias. Se obtuvo una tasa de recombinación positiva de aproximadamente el 20%, habiendo electroporado 120-140 clones de células troncales embrionarias por cada exón. Una vez seleccionados clones positivos, validamos la correcta inserción del transgén (*Tg*) de nuevo sólo en los clones seleccionados previamente. Los clones positivos fueron microinyectados en blastocistos y posteriormente implantados en el útero de hembras pseudogestantes (Figura 9). Los procesos empleados con manipulación de células pluripotentes y blastocistos de ratón fueron realizados en el CNIC por las unidades técnicas especializadas.



**Figura 9. Diagrama del proceso de generación de organismos modificados genéticamente.** El vector transgénico es introducido en células embrionarias de ratón por electroporación, y la inserción por recombinación homóloga es validada por *southern blot*. Las células embrionarias con la recombinación son inyectadas en blastocistos de ratón y estos implantados en hembras pseudogestantes.

La transmisión de la modificación genética a la línea germinal se comprobó por PCR de ADN genómico (ADNg) en la primera generación (F1) de las quimeras cruzadas con animales de genotipo silvestre (Fig. 10a-10b). En cada caso, se usaron aproximadamente 4-6 quimeras de las cuales 2-3 transmitieron a la descendencia. Ratones de la F1 se cruzaron con animales modificados genéticamente que expresaban la recombinasa FRT de forma ubicua (JAX 003946). De esta forma se eliminaba el casete de selección que incluía la resistencia a la neomicina, también comprobado por PCR de ADNg (Fig. 10c). A partir de esta segunda generación se mantuvieron las líneas durante al menos 7 generaciones cruzándose con animales de genotipo silvestre C57BL/6 para establecer un fondo genético homogéneo. A continuación se cruzaron machos y hembras portadores de la modificación en heterocigosis para generar las líneas homocigotas (Fig. 10a). Por último, se cruzaron con ratones que expresaban la recombinasa Cre fusionada al receptor de estrógenos modificado ( $Cre^{ERT2}$ ) que expresaban una versión inducible de la recombinasa Cre bajo el control de promotores específicos de tejido. Para ello se usó el promotor *Myh11* (cadena pesada de la miosina de músculo liso), específico de células de músculo liso ( $Myh11-Cre^{ERT2}$ )<sup>167</sup> o el promotor *Cdh5* (caderina de endotelio vascular) específico de CEs ( $Cdh5-Cre^{ERT2}$ )<sup>168</sup>. Los animales con el exón 6 flanqueado por loxP también

fueron cruzados con animales *Ubc-Cre<sup>ERT2</sup>*, que expresan la forma inducible de Cre bajo el control del promotor *Ubc* (ubiquitina C) expresado en la mayoría de las células<sup>169</sup> (Fig. 10a y 10d). Una vez realizados estos cruces, los animales se mantuvieron en homocigosis para el locus *Rcan1* modificado y en hemicigosis para *Cre<sup>ERT2</sup>*. Adicionalmente, se usaron ratones “reporters” con una inserción en el locus *Rosa26* (*R26*) de una proteína fluorescente (YFP o tdTomato) precedida por una región de parada flanqueada por sitios loxP (LSL): *Rosa26-LSL-YFP* (*R26-YFP<sup>LSL</sup>*) y *Rosa26-LSL-Tomato* (*R26-Tomato<sup>LSL</sup>*) para detectar la actividad de la recombinasa Cre, en combinación con ratones *Myh11-Cre<sup>ERT2</sup>* y *Cdh5-Cre<sup>ERT2</sup>*, respectivamente (JAX 007905 y 006148, respectivamente). Los ratones aquí descritos se muestran en la Tabla 2 con las modificaciones genéticas que portan y la nomenclatura empleada.



**Figura10. Estrategia de cruces para la generación de animales transgénicos inducibles y condicionales de tejido.** (a) Esquema de la estrategia de cruces seguida desde la obtención de quimeras. (b) Esquema representativo de los loci de las quimeras que han incorporado el casete de recombinación e imágenes representativas mostrando los productos de PCR de ADNg de las crías obtenidas en la primera generación (F1). Los asteriscos indican animales que han heredado la modificación genética (Tg) (c) Esquema representativo de los loci de las quimeras que han incorporado el casete de recombinación y han sido sometidos a recombinación con la recombinasa FLP. Se muestra una imagen representativa de los productos de PCR de ADNg indicando los productos correspondientes a alelos con el casete Neo (*Neo-loxP*); alelos en los que se ha eliminado el casete de selección (*loxP*); o el alelo silvestre (*Wt*). Los asteriscos indican recombinación positiva de sitios FRT (alelo *loxP*). (d) Esquema de los transgenes presentes en los animales utilizados para cruces, expresando la recombinada *Cre<sup>ERT2</sup>* bajo el control del promotor de *Myosin heavy chain 11* (*Myh11*) específico de células de músculo liso; del promotor de *Vascular Cadherin 5* (*Cdh5*) específico de células endoteliales (CEs); o del promotor *Ubiquitin C* (*Ubc*), de expresión ubicua.

<i>Locus loxP</i>	Promotor Cre	Isoforma diana	Tejido diana	Denominación
Exón1	No Cre	Rcan1-1	-	<i>Rcan1-1<sup>loxP/loxP</sup></i>
Exón4	No Cre	Rcan1-4	-	<i>Rcan1-4<sup>loxP/loxP</sup></i>
Exón6	No Cre	Rcan1-1 y Rcan1-4	-	<i>Rcan1<sup>loxP/loxP</sup></i>
Exón1	<i>Myh11</i> -Cre <sup>ERT2</sup>	Rcan1-1	Músculo liso	<i>SM-Rcan1-1<sup>-/-</sup></i>
Exón4	<i>Myh11</i> -Cre <sup>ERT2</sup>	Rcan1-4	Músculo liso	<i>SM-Rcan1-4<sup>-/-</sup></i>
Exón6	<i>Myh11</i> -Cre <sup>ERT2</sup>	Rcan1-1 y Rcan1-4	Músculo liso	<i>SM-Rcan1<sup>-/-</sup></i>
Exón1	<i>Cdh5</i> -Cre <sup>ERT2</sup>	Rcan1-1	Endotelio	<i>EC-Rcan1-1<sup>-/-</sup></i>
Exón4	<i>Cdh5</i> -Cre <sup>ERT2</sup>	Rcan1-4	Endotelio	<i>EC-Rcan1-4<sup>-/-</sup></i>
Exón6	<i>Cdh5</i> -Cre <sup>ERT2</sup>	Rcan1-1 y Rcan1-4	Endotelio	<i>EC-Rcan1<sup>-/-</sup></i>
Exón6	<i>Ubc</i> -Cre <sup>ERT2</sup>	Rcan1-1 y Rcan1-4	Ubicuo	<i>Ubc-Rcan1<sup>-/-</sup></i>
Exón6	No Cre	Rcan1-1 y Rcan1-4	Ubicuo	<i>Rcan1<sup>-/-</sup></i>
Rosa26-LSL-YFP	<i>Myh11</i> -Cre <sup>ERT2</sup>	-	Músculo liso	R26-YFP <sup>LSL</sup>
Roa26-LSL-Tomato	<i>Cdh5</i> -Cre <sup>ERT2</sup>	-	Endotelio	R26-Tomato <sup>LSL</sup>

Tabla 2. Animales utilizados especificando las isoformas y tejidos diana de la delección y la nomenclatura empleada.

Todos los animales fueron genotipados mediante PCR usando muestras de ADNg obtenidas de la cola (PCR genotipado). Muestras de animales administrados con tamoxifeno también se usaron para extraer ADNg y observar la recombinación por PCR (PCR recombinación) según la estrategia mostrada en la Figura 11. Las secuencias de los oligonucleótidos se especifican en la Tabla 3.

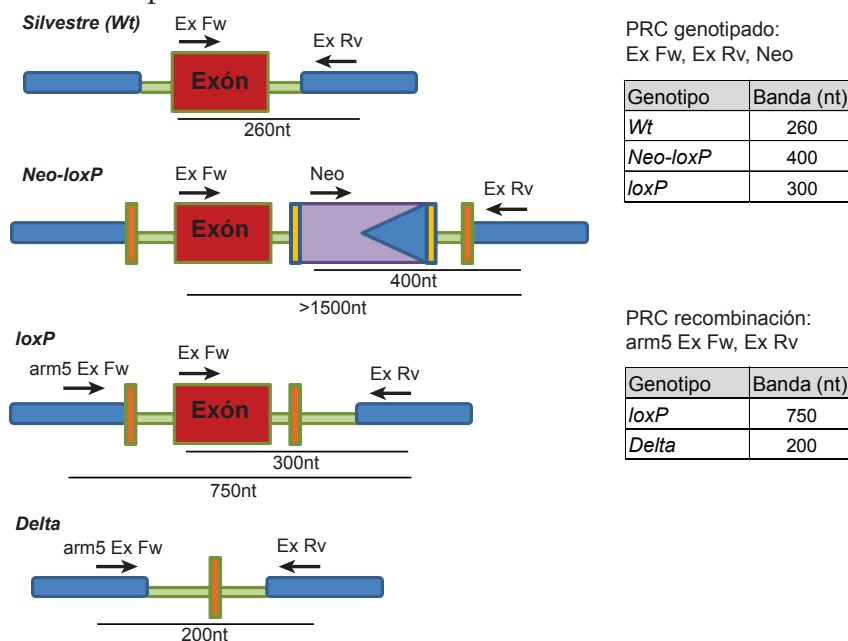


Figura 11. Esquema de la estrategia de genotipado seguida durante el proceso de generación y establecimiento de las líneas de ratón modificadas genéticamente. *Neo-loxP*, alelo con el casete de selección Neo y sitios FLP (cajitas amarillas). *loxP*, alelo tras la recombinación con la recombinasa FLP y eliminación del casete de selección, mantiene sitios loxP (cajitas naranjas). *Delta*, alelo tras la recombinación de los sitios loxP por la recombinasa Cre. Los oligonucleótidos empleados en cada caso para el genotipado se indican a la derecha y en la Tabla 3 y su posición relativa al locus está indicada mediante flechas.

Nombre	Secuencia	PCR
<b>Ex1 Fw</b>	CGGAGGGCGGACACTTG	Genotipado Exón1
<b>Ex1 Rv</b>	GAGCGACATGCCACCATCAG	Genotipado Exón1/Delta
<b>arm5 Ex1 Fw</b>	GACTTGATGGCCCGAGTG	Recombinación
<b>Ex4 Fw</b>	GCAAACGATGATGTCTTCAGCG	Genotipado Exón4
<b>Ex4 Rv</b>	GCTCGGTATGGCCACACAC	Genotipado Exón4/Delta
<b>arm5 Ex4 Fw</b>	CACAGCTCCTGCATTATCC	Exón4 Delta
<b>Ex6 Fw</b>	GGGAGGTGTGGAGAGACTCTC	Genotipado Exón6
<b>Ex6 Rv</b>	CTGGAGTGAGCCACACAGG	Genotipado Exón6
<b>arm5 Ex6 Fw</b>	CCATGTAACAGGTTACCACAGG	Recombinación
<b>Ex6 Rv2 arm</b>	CCTGCTGGGTGAAGGGATAG	Recombinación
<b>Ex Neo común</b>	GCTGACCGCTTCCTCGTG	Genotipado Neo común
<b>Cre Fw</b>	GCCTGCATTACCGGTCGATGCAACGA	Genotipado Cre
<b>Cre Rv</b>	GTGGCAGATGGCGGCAACACCATT	Genotipado Cre
<b>Cre SM Fw</b>	GCCTGCATTACCGGTCGATGCAACGA	Genotipado Cre SM
<b>Cre SM Rv</b>	GTGGCAGATGGCGGCAACACCATT	Genotipado Cre SM

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para PCR de genotipado o de comprobación de recombinación.

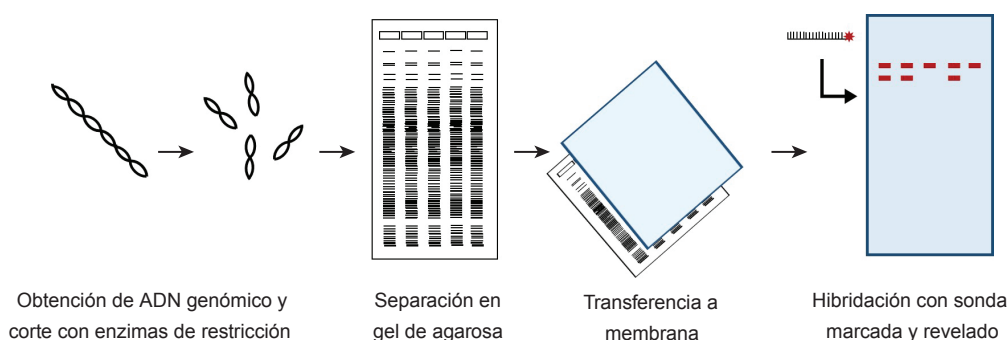
## 2. Southern blot

Los clones de las células troncales electroporados con las construcciones genéticas y resistentes a neomicina fueron lisadas en 100µl de tampón de extracción (Tabla 4) y el ADNg fue extraído tras 1 hora de incubación a 65°C con agitación. El ADNg (aproximadamente 100 µg) fue digerido 2-4 horas con enzimas de restricción (1000 unidades) en un volumen final de 40 µl, según la estrategia diseñada para cada exón: ApaI para el exón 1 y BamHI para los exones 4 y 6. El producto de la digestión fue fraccionado en un gel de agarosa (0,7%) preparado en tampón TAE (Tabla 4) mediante electroforesis a 30 Voltios durante 6-8 horas (hasta salirse el frente de carga). Tras la obtención de imágenes del gel teñido con bromuro de etidio e iluminado con luz ultravioleta, el ADN fue transferido a una membrana de nailon en condiciones desnaturizantes (Fig. 12). Para ello, el gel de agarosa se incubó 30 minutos en un tampón de desnaturalización ácido (Tabla 4), posteriormente 20 minutos en un tampón de desnaturalización alcalino (Tabla 4) y finalmente se lavó 3 veces en un tampón de neutralización (Tabla 4). La transferencia del gel de agarosa se realizó mediante capilaridad a una membrana de nailon usando tampón SSC 2x. Una vez transferido, la membrana de nailon se lavó en tampón SSC 2x, se dejó secar sobre papel *whatman* y se expuso a luz ultravioleta durante 2 minutos para enlazar (*cross-link*) el ADN a la membrana. La membrana se hidrató de nuevo con tampón SSC 2x y se bloqueó durante 1 hora a 65°C con tampón de hibridación (Tabla 4) suplementado con 2% de espermatozoos de salmón. A continuación se lavó con tampón SSC 2x y se incubó con la sonda marcada con <sup>32</sup>P (25ng/ml) en tampón de hibridación durante 90 minutos

## Materiales y Métodos

a 65°C. El tampón con la sonda fue retirado y la membrana se lavó al menos 2 veces durante 15 minutos con SSC 2x suplementado con 1% SDS y un lavado final de 15 minutos con SSC 2x suplementado con 0,1% SDS. La radiactividad emitida por la sonda se reveló en un equipo de detección de rayos-X (KODAK Medical X-Ray Processor).

Las sondas (Tabla 5) se marcaron con  $^{32}\text{P}$  en su extremo 5', incubando la sonda con  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  en presencia de la polimerasa de ADN T4 durante 1 hora a 37°C. Posteriormente las sondas se lavaron usando columnas *Micro Bio-Spin* (Bio Rad, 7326223).



**Figura 12. Diagrama representativo del procedimiento experimental de *southern blot*. (a)** Esquema resumido del proceso. **(b)** Esquema de la pirámide de transferencia mostrando sus componentes.

Tampón	Composición
TAE	40mM Tris acético, 2mM Na <sub>2</sub> EDTA 2H <sub>2</sub> O
Extracción ADNg	10mM Tris-HCl pH 8, 400mM NaCl, 2mM EDTA, 1mg/ml ProteinasaK
Desnaturalización ácida	25mM de HCl
Desnaturalización básica	1,5M NaCl; 0,5M NaOH
Neutralización	1,5M NaCl; 0,5M Tris-HCl pH 7
SSC 20x	3M NaCl; 0,3M Na <sub>3</sub> citrato; 2H <sub>2</sub> O pH 7
SSC 2x	0,3M NaCl; 0,03M Na <sub>3</sub> citrato; 2H <sub>2</sub> O pH 7
Hibridación	SSC 5x; 0,1% Na-Lauroil sarcosinato; 0,02% SDS

**Tabla 4. Tampones empleados en *southern blot* y su composición.**

Sonda	Secuencia
Exón1 5'	AAAGAA TCCGCATTGTGTCCACATGCAAAATGAAGAGAAATGCCAACAGCTAGTAGCCCTCAAACTGAAATTTATGGCTGGGTTCCCCCTGGGTTAATATATGATAGATCATCAAAACGACCTGAGCTTTTAAAGGCATGAACCTTTAAAGGATGAACCTGGTGGTTAGTAAAGAAATGGTCCACAGATTCATGTGTTGAAATGCTGGCCATAGGGAGTGGCCA GAGGCTAATTAGGAGGTGTGGCCCTGTTGGAAAGAAATGTGTGTCATAAGTACAGAGGCTGAGGATCATATATGTTCAAGATTGCCAAGTGTGGCACACAGCTCCCTTCGCTGCCTGCAGATCAAGGCAAAAGGCCCTCATCTCCCTTCTATCACCATGTGTCTACACCGGTGCAAGG
Exón1 3'	GACTGTTACC GGGAAACCTCAGTCGTTTGGATGGCCGAAACACTGGAGGTGTCTTTGTTCCCTGGCTCTTGGGCCCTCCACAGGGCAGCTCACAGCGGTGGCTGCCTTCC TTACAGAGCAGGAGAGAAACCCACCATTCCCTCCCTGAGTCTCCAGTGAAGCCACACTGTGCTGTTCTTAGGAGTGAAGCAAGGACAGGTTTCGTTACAGGATTTGGCCTTCTAATTTCCCTAATCTTAGACACACAGATACCACTATCCAAAAGGCACTAGTGTGGGAGCTGGGTACCCAGGACCCAGCCACTAGTGGCACCACAGTGGGACCTT TGGCATCCCTGTTAATTTACTTTTGGACAGACCTCAGGAAAGAACCGCAGTGGTCCCTGAACTCGATTAAGTAGCCGAGACAGACCGTAGACTGCCCTAGTTCCTCCAGTTGGCTGGGG TTTCAAGGTGGCAGCACCAIACCTGTTGGGTTGTGGGTTGGCTG
Exón4 5'	CTGTTTTCTGTCGCTGTGGAACAAGTTACAGCAGATGCCGTGGTTTTGCCCCATCAGGGTCTGACAGGCTGGAGGTTGGGAAAGACCAGGCACCGCTCATGAGGTGTTCTCAGCTCT TAGAGGCTGGA AACAGGGTCCCGGCTGGTCTGCACGGCTGTCCGGGAACTGTGAAGGGGAGCTTACTTTCAGGCTGCTCAGATTCTTCTCCCTGAGGTGGGCCCTGGCTCC TCAGGGCCGCTTGGCTTCCTGCCACGAGACTCCCTCCATTGTGAGAGTCAAGAAATGGCTCACCAGCCCTTGTGCTTTTCAAGACACACAGTTACCCAGGCTGGCCT TGAGCTCACGGGGTAGCCAGCTAACCTCAAACCTTGGAAATTCGCCCATCTCAGTCTCCAAAAGGCTTGG
Exón4 3'	ACGAGAGACCGGAGTACACACCCCATCCACCTCAGCTGAAACCGGGCCGACAGACTGAGACAGCCGCTCTGAAATCCACAGCTGTGGAAAGAAATCTTTTACTGTGCAGGTGGCTGG CCGTGGCTTTGGAGGGAGCGGGCCGTGACCACCTGTGGCAGAAATTCCAAGTTCAATGATGCTCAGAAAGAGAGTCAAGGCCCTCCCTGTTCTGTGATGCTGCCCTCAGTCCA TGTCCACGGCACCTGGGACGTCTTTGGGCCATTCACTGAAATGTGTGGCAGTCAACACAAGGACACTGGGGACATCCTGAGAAAACCTGATAGTTCTTGTAAATTGCTCAATTTCTA GGTTCGTGTTTTGGCAAGGACAGGTTGACTGGTGGCCCAAGGGAGAAATTTCTGTTTCCAACACAGAGTTGAGG
Exón6 5'	GACTGCCAGTTCCCTCCCAAGGCCCTAGTGCAGTGTCTGTGTCCCCAGGGCTGCCCTGAAAGGAAACTTCCAGAAGGTTTCTCAAACTCTGAAAGAGAGCAGGAATGAGCTGCTGCC TGGGAGAGACAGAGCTGAGGAGAGAGAGGCCCCGCCAGAAAAGCAGCTCACACTCAGGGAGACAAAAGGATGGGATGGACTTGTGGAAAAGATTTGAGTTGAGGATTTGGAAAAGCC ATTTGACACACCTGGATGAAAGGAAAGACAGCCATGTGGGTGAAGCCCGCAGGGGAGGTGGGTGTCAAGCCGGGCTGGCCAGGGTCCCCACTGGCAGCAGCCCCAAGGTTTTGTGTG AGATTGAAAGCATCTGCCCTTGGGTGAAGACTGCATCAGAGCAGAAAGTAAAGTCTGTAAGGACAGGTCGAGTCTGGAAAAGAACAGGC
Exón6 3'	GGGGTTTCTAATTCCTGCACAAAACATCATGACCAAGAAA CAAGTTGGGGAGGAAAAGGTTTATTCAAGCTCACACTTCCACATTTGCTGTTCAATCACCAAAAAGGAAAGTCAGGACT GGAACCTAAGCAGAGGGCAGGAAAGCAGAGCTGATGCAGAGACCTTTGAGAGGATGTTACTGGCTTCCCCAGCCCTGCTCTCTATAGAAACCAAGACAAACAGCCCAAGT GATGTACCAACCTATAAAGGGGCTTTCCCCACTTGGATCACTAATTAAGAAAATGCCCCACAGCTAGATCTCATGGAGGCAATTTCCCTCAACTGAAACTCCTTACTTTGTGATFAA CTCGAGCTGTGCAAGTTGACACAAAACCCAGCCAGTTTCATGATGTTTACAAAATACTAATTAATGCTCCCTCCCAAGAACAGCAAAAGCTCGTCTGCTGGTCCCATTTGTGCC CCACTCTTCCCTTGTAAATGACCGTTGCCCT

Tabla 5. Sondas empleadas para experimentos de southern blot.

### 3. Modelos animales

#### 3.1. Tratamiento con tamoxifeno

El tamoxifeno (Sigma-Aldrich, T5648) se preparó a 5 mg/ml en una solución de 90% de aceite de maíz y 10% de etanol. Para facilitar la disolución del tamoxifeno, la preparación se sonicó en un sonicador Bandelin de vástago durante 20 minutos en hielo, ciclo 5 potencia 50%. Se preparó al mismo tiempo una solución vehículo consistente en 90% de aceite de maíz y 10% de etanol. Para ratones de 8 semanas y peso aproximado de 25g, se inyectó por vía intraperitoneal una dosis diaria de tamoxifeno de 1 mg en 200µl durante 5 días consecutivos<sup>170</sup>, hasta un total de 5mg por ratón. Como ratones control se emplearon ratones Cre<sup>ERT2</sup> negativos inyectados con tamoxifeno o ratones Cre<sup>ERT2</sup> positivos tratados con vehículo.

#### 3.2. Infusión de Ang-II en modelo de HIM en ratón

El estudio del efecto directo de Ang-II *in vivo* se realizó mediante la infusión sistémica de 1 µg/kg/min de Ang-II (Sigma-Aldrich, A9525) con mini-bombas osmóticas subcutáneas (Alzet, Charles River, modelos 2001 y 2004) durante tiempos establecidos (6 horas; 1, 7 y 28 días). Los animales usados fueron ratones *Rcan1*<sup>+/+</sup>, *SM-Rcan1*<sup>-/-</sup>, *SM-Rcan1-1*<sup>-/-</sup>, *SM-Rcan1-4*<sup>-/-</sup>, *EC-Rcan1*<sup>-/-</sup>, *EC-Rcan1-1*<sup>-/-</sup>, *EC-Rcan1-4*<sup>-/-</sup>, *Rcan1*<sup>-/-</sup>, *Ubc-Rcan1*<sup>-/-</sup>, todos en fondo genético C57BL/6 y de 2 meses de edad. Los animales fueron anestesiados mediante inhalación de isoflurano (inducción 3-5%, mantenimiento 1-2%) y en ellos se realizó una incisión superficial en la parte dorsal donde se implantó de forma subcutánea la mini-bomba. Posteriormente, la herida fue cerrada con sutura o con grapas quirúrgicas. Después de los tiempos establecidos, los animales fueron sacrificados (n=5-12 animales por grupo en cada experimento).

En los experimentos de infusión por Ang-II con monitorización de la PA, se utilizó un sistema de medición en cola “tail-cuff” (BP-2000, Visitech System), técnica no invasiva en la que el ratón se introduce sin sedación en una caja donde un manguito mide la PA a través de la cola. En los casos indicados, los animales fueron tratados con amlodipino (Aml) (6mg/kg/día, Sigma-Aldrich, A5605), mediante mini-bombas osmóticas; o con NG-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) (0,5g/L; Sigma-Aldrich, N5751) o Fasudil (1mg/ml; LC-Laboratories, F-4660), administrados en el agua de la bebida reponiendo el agua cada 3 días. La Figura 13 muestra un esquema representativo de los modelos de HIM por infusión de Ang-II.

Para la cuantificación del área ocupada por el HIM se utilizó el programa ImageJ, donde se utilizó el canal más contrastado y se estableció un *threshold* que resaltara la sangre, estableciendo el mismo valor para todas las imágenes. Se cuantificaron 3 secciones separadas

25µm por cada lesión. En el caso de animales que tuvieran más de una lesión, se consideró cada HIM como lesión independiente.

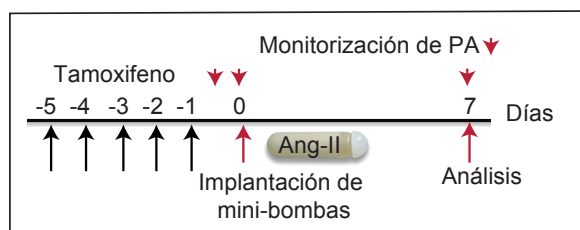


Figura 13. Esquema temporal del protocolo de infusión de Ang-II para la inducción de HIM. Las flechas negras indican la administración de tamoxifeno. Las flechas rojas inferiores indican principio y fin de tratamiento con Ang-II (1 µg/kg/min).

### 3.3. Modelo de desarrollo de AAA por infusión de Ang-II

Animales *Rcan1<sup>+/+</sup>*, *SM-Rcan1<sup>-/-</sup>*, *EC-Rcan1<sup>-/-</sup>*, *Ubc-Rcan1<sup>-/-</sup>* y *Rcan1<sup>-/-</sup>* de 2 meses de edad fueron tratados con 1 µg/kg/min de Ang-II durante 7 o 28 días mediante implantación subcutánea de mini-bombas osmóticas. El diámetro aórtico abdominal fue monitorizado previamente a la infusión de Ang-II (Pre Ang-II) y tras 7, 14, 21 y 28 días de tratamiento mediante ultrasonidos de alta frecuencia con el sistema VEVO770, con un protocolo previamente descrito<sup>171</sup> (Fig. 14). Durante el proceso de medición los animales permanecieron anestesiados mediante inhalación de isoflurano (inducción 3-5%, mantenimiento 1-2%). Las medidas de diámetro aórtico máximo se realizaron a nivel de la aorta suprarrenal y de la AoAsc.

Considerando diámetros basales de 1 mm, las aortas suprarrenales con diámetro externo igual o superior a 1,5 mm fueron consideradas AAA. Diámetros superiores a 1,2 pero inferiores a 1,5 se consideran dilatación moderada. Los animales fueron sacrificados con CO<sub>2</sub> tras los 7 o 28 días de tratamiento y perfundidos con salino para la obtención de las aortas y su posterior análisis histológico.

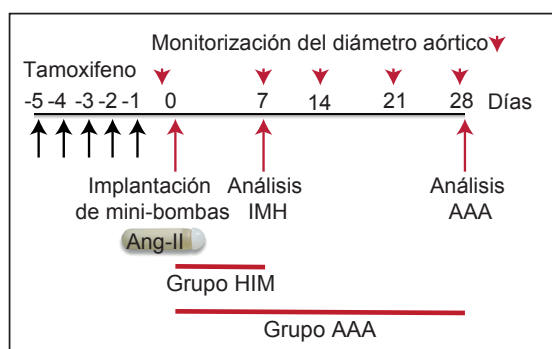


Figura 14. Esquema temporal del protocolo de formación de AAA por infusión de Ang-II. Flechas negras, administración de tamoxifeno. Flechas rojas, principio y fin de tratamiento con Ang-II (1 µg/kg/min) en los dos grupos indicados por las líneas rojas: 7 días (HIM) y 28 días (AAA) de tratamiento.

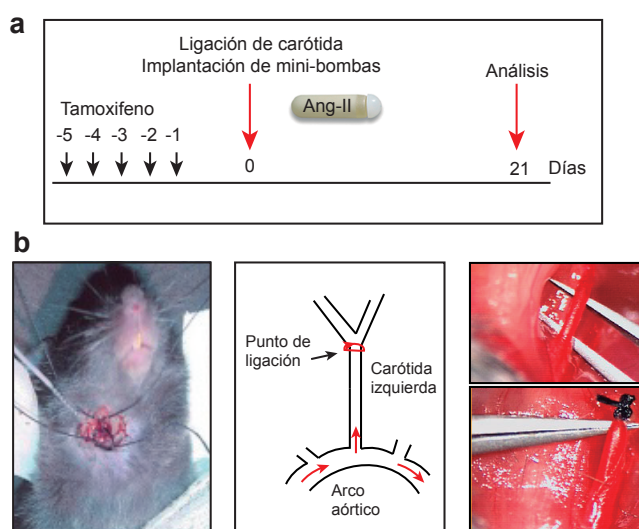
### 3.4. Modelo de permeabilidad *in vivo*

Para los estudios de permeabilidad en ratón, se inocularon un dextrano de 10kDa marcado con Rhodamina B (RhodB; longitudes de onda de excitación a 540nm y de emisión a 625nm) y un dextrano de 70kDa marcado con Isotiocianato de Fluoresceína (FITC; longitudes de onda de excitación a 490nm y de emisión a 525nm)<sup>172</sup>. Para la inoculación, los ratones fueron

introducidos con antelación en una cámara a 39°C e inmovilizados en un cepo especial para ratones. Se les inyectó una solución con 0,2 mg de cada dextrano en un volumen de 200µl en una de las venas caudales. Posteriormente, se presionó durante 1 minuto la zona donde se había producido la inyección para evitar la pérdida de sangre. Tras la inyección se esperaron 20 minutos para permitir que los dextrans difundieran por los tejidos y se sacrificaron los animales en una cámara de CO<sub>2</sub>. Los animales fueron perfundidos con suero salino desde el corazón para eliminar la sangre y restos de dextrans de la circulación y se procesaron los tejidos en fresco como se describe más adelante (apartado 10).

### 3.5. Modelo de formación de neoíntima por ligación de carótida

Los animales se anestesiaron mediante la administración intraperitoneal de una mezcla de anestésico/analgésico: Ketamina (100mg/kg) y Xilacina (20mg/kg) en solución salina. Los animales fueron colocados sobre una placa térmica durante la intervención. Se abrió un bolsillo quirúrgico en el cuello del ratón hacia el lado izquierdo de la tráquea para localizar la carótida izquierda a la altura de la bifurcación donde se separan las carótidas interna y externa. La arteria carótida fue disecada y anudada con un hilo obstruyendo el flujo por completo a la altura de la bifurcación. La herida se cerró con puntos de sutura. Se implantaron mini-bombas osmóticas de Ang-II (0,5 µg/kg/min) siguiendo el procedimiento descrito en 2.2. Se aplicó antiséptico y analgésico (buprenorfina, 0,1 mg/Kg, s.c.) en las primeras 24 horas. Los animales fueron sacrificados 21 días después de la intervención y perfundidos con salino. Los órganos fueron extraídos y procesados para su estudio posterior. En la Figura 15 se muestra un esquema del abordaje experimental.



**Figura 15. Esquema del modelo de formación de neoíntima por ligación de carótida.** (a) Esquema temporal del protocolo experimental. Flechas negras, administración de tamoxifeno. Flechas rojas, inicio del daño (ligación y administración de Ang-II 0,5 µg/kg/min) y final del experimento. (b) Esquema de cirugía mostrando la apertura del bolsillo quirúrgico (izquierda), un esquema de localización de la ligación (centro) e imágenes de la arteria antes y después de la ligación (derecha, arriba y abajo, respectivamente).

Para la cuantificación de la neointima, se midió el área de neointima como el área contenida entre el endotelio (el borde del lumen) y la lámina elástica interna; y el que sería el área del lumen si no existiese patología (área delimitada por la lámina elástica interna). El porcentaje de estenosis se expresó como porcentaje de oclusión del lumen, o el porcentaje del área inicial del lumen que fue ocupado por la neointima.

## 4. Cultivos celulares

### 4.1. Células de músculo liso vascular (CMLVs) de ratón

Las CMLVs fueron aisladas de aortas como se describió anteriormente<sup>173</sup>. Brevemente, las aortas de ratones C57BL/6 silvestres, *Rcan1*<sup>-/-</sup>, *Rcan1*<sup>loxP/loxP</sup>, *Rcan1*<sup>4loxP/loxP</sup> y *Rcan1*<sup>loxP/loxP</sup> fueron extraídas y mantenidas en PBS frío en campana de cultivos mientras se eliminaban con unas pinzas la grasa y el tejido conectivo que las rodeaban. Posteriormente, fueron cortadas en pequeños anillos que se digirieron 2h a 37°C en DMEM (Invitrogen, 11965-092) suplementado con 1 mg/ml de colagenasa tipo II y 0,5 mg/ml de elastasa (Worthington, LS004174 y LS002290). Tras la adición de DMEM suplementado con 20% de FBS, la suspensión celular obtenida fue centrifugada a 200 rcf, resuspendida en DMEM suplementado con 20% de FBS y sembrada posteriormente en placas de cultivo. Después de 2 días se retiró el medio para eliminar los restos de tejido no adheridos y se añadió medio DMEM fresco suplementado con 20% de FBS. Cuando las células alcanzaron la confluencia, el cultivo fue tripsinizado y sembrado posteriormente a una dilución 1:3. Todos los experimentos con CMLVs descritos en este trabajo se realizaron con células de pase 3-7. Antes de los experimentos de estimulación, el medio de cultivo de las células fue sustituido por DMEM (sin FBS) durante 48h.

### 4.2. Células endoteliales de pulmón de ratón (MLECs)

La preparación de CEs a partir de pulmón se realizó siguiendo los protocolos descritos con anterioridad<sup>174,175</sup>. Las CEs de pulmón de ratón se obtuvieron a partir de pulmones de ratones sacrificados mediante dislocación cervical. Los pulmones fueron digeridos con una solución de 0,2% de colagenasa tipo I (Gibco, 17100017) en DMEM durante 1h a 37°C y posteriormente disgregados para conseguir una suspensión de células homogénea. Las CEs presentes en esta suspensión fueron seleccionadas positivamente empleando un anticuerpo anti-ICAM-2 (BD Biosciences, 553326) y bolas magnéticas (DynaL Thermofisher, 11035), suspendidas en medio DMEM F-12 (BioWhittaker BE, 12-719F) suplementado con FBS (20%), heparina (100 mg/ml) (Sigma-Aldrich, H3393), factor de crecimiento de células endoteliales (ECGF) (5 mg/ml), l-glutamina (2mM) (Sigma-Aldrich, 7513), y antibióticos (100 unidades/ml

penicilina y 100 µg/ml estreptomina) y sembradas en placas de cultivo recubiertas con 0,5% gelatina más 100 mg/ml de colágeno tipo I (Sigma-Aldrich, C2124-50ML). Este protocolo permitió obtener una población enriquecida en CEs (> 80% de pureza).

### **4.3. Células endoteliales humanas de vena de cordón umbilical (HUVEC)**

Las células HUVEC fueron aisladas de cordón umbilical humano de acuerdo al protocolo descrito anteriormente<sup>176</sup>. Para el crecimiento y mantenimiento de las células HUVEC se utilizó medio EGM-2 (Lonza) suplementado con 10% FBS. El medio EGM-2 contiene suplemento de heparina, ácido ascórbico, hEGF, hFGF, GA-100, R3-IGF-1, hidrocortisona y VEGF. Para los experimentos de permeabilidad con las células HUVEC se mantuvo el medio de cultivo hasta conseguir una monocapa homogénea.

### **4.4. Células embrionarias de riñón humano (HEK 293T)**

Las células HEK 293T (ATCC) fueron mantenidas en medio DMEM suplementado con 10% de FBS, 2 mM de l-glutamina y 100 U/ml de penicilina y estreptomina. El cultivo fue dividido cada 3 días aproximadamente según los requerimientos de crecimiento y confluencia.

### **4.5. Células Jurkat**

La línea celular Jurkat de linfocitos T humanos (ATCC) fue mantenida en medio RPMI suplementado con 10% de FBS, 2 mM de l-glutamina y 100 U/ml de penicilina y estreptomina. El cultivo fue dividido cada 3 días aproximadamente según los requerimientos de crecimiento y confluencia. Estas células se utilizaron para la titulación de lentivirus.

## **5. Transfección**

### **5.1. HEK 293T (para producción de partículas lentivirales)**

Para la producción de partículas lentivirales, las células HEK 293T se transfectaron con la técnica de fosfato cálcico. Las células se sembraron en placas de 150mm de diámetro a una confluencia del 30% en DMEM suplementado con 10% FBS, 2mM l-glutamina, 100 U/ml de penicilina y estreptomina. Una vez adheridas a la placa, las células se cotransfectaron con (i) plásmido pMD2G (11 µg), que codifica la glicoproteína de la envuelta viral (obtenido de M. K.Collins del University College London, UK); (ii) el plásmido 8.9 (35,25 µg), que codifica los genes *gag*, *pol* y *rev*; y (iii) el vector lentiviral codificante de la proteína de interés (27,5 µg) en 1250 µl de HBS 1x (10mM de HEPES, 150 mM de NaCl, 1 mg/ml de Dextrosa, 3,7 mg/ml de

KCl, 1,86mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ). Después se añadieron 75  $\mu\text{l}$  de  $\text{CaCl}_2$  (2,5 M), se mezcló con ayuda del vórtex y la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Posteriormente, esta mezcla fue añadida sobre las células gota a gota. Transcurridas 16 horas, se cambió el medio de cultivo a 12,5ml de DMEM suplementado con 10% FBS, glutamina, penicilina, estreptomycin y las células se mantuvieron a 37°C y 5% de  $\text{CO}_2$ .

## 5.2. HUVEC

HUVECs fueron sembradas en pocillos de p35 para el estudio de los ARN pequeños de interferencia (ARNi o *siRNA*) o en pocillos de p96 para los ensayos de permeabilidad. Las células fueron sembradas para conseguir una confluencia del 60%. Las HUVECs fueron transfectadas con ARNi empleando Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher). Se utilizaron dos ARNi diferentes con secuencias diana en el ARNm de *RCAN1*: siRCAN1#1 y siRCAN1#2 (Sigma Aldrich, Hs02\_00337560 y Hs01\_00014303). Los dos días posteriores y consecutivos al sembrado de las células, se transfectaron usando 25pmol de ARNi por pocillo en el caso de los pocillos p35 y 1pmol de ARNi por pocillo en el caso de los pocillos de p96. Los ensayos se realizaron en el cuarto día tras el sembrado.

## 6. Producción de vectores lentivirales

El ADN de la región codificante de la recombinasa Cre fue clonado en el plásmido pHRSIN<sup>177</sup> bajo la regulación del promotor SFFV (*spleen focus-forming virus*). Este vector contiene a continuación la región codificante de la proteína fluorescente verde (GFP) bajo el control del promotor de la ubiquitina<sup>177</sup>. Todas las partículas lentivirales se generaron mediante transfección con fosfato cálcico en HEK 293T como se ha explicado en el apartado anterior. El sobrenadante de estas células fue recogido 48h después de la transfección, centrifugado 10 minutos a 560 rcf para eliminar los restos celulares, y ultracentrifugado durante 2h a 120000 rcf a 4°C (Ultraclear Tubes, SW28 rotor y Optima L-100 XP Ultracentrifuge; Beckman). Las partículas virales fueron resuspendidas en DMEM estéril a 4°C y se congelaron a -80°C para su conservación. El número de partículas infectivas obtenidas fue titulado mediante infección de células Jurkat. Las células Jurkat se infectaron con 1 $\mu\text{l}$ , 0,1 $\mu\text{l}$  ó 0,01 $\mu\text{l}$  de sobrenadante de virus y tras 5 horas de infección el medio fue remplazado por medio nuevo. Las células se incubaron toda la noche y posteriormente la eficiencia de infección (células Jurkat positivas para GFP) y la muerte celular (incorporación de yoduro de propidio) se analizó mediante citometría de flujo usando el citómetro BD FACS Canto II (BD Biosciences). Para calcular el título (unidades infectivas pfu/ml), asumimos que cuando el porcentaje de células GFP positivas es inferior al 10%, cada célula ha sido transducida por una sola partícula viral.

## 7. Transducción de CMLVs con vectores lentivirales

Las CMLVs se sembraron en placas de 35 mm de diámetro ( $0,5 \times 10^6$  células/placa) para conseguir una confluencia del 60% en el momento de la infección. Las células se infectaron con  $5 \times 10^6$  partículas infectivas (10 por célula) en DMEM suplementado con 20% FBS y se incubaron durante 5h a 37°C. Posteriormente, el medio fue remplazado por medio fresco. Las células se mantuvieron durante 72h y la infección se comprobó mediante detección de GFP por citometría de flujo usando un citómetro BD FACS Canto II (BD Biosciences).

## 8. Ensayos de permeabilidad *in vitro*

HUVECs fueron sembradas en cámaras de permeabilidad ajustadas a pocillos de p96 (Corning, 3384) a una concentración de 8.000 células por cámara. Las células fueron transfectadas con ARNi específicos para el silenciamiento de *RCAN1* según el protocolo explicado en 5.2. Al cuarto día tras la siembra de las células, medio EGM-2 con 1mg/ml de dextrano-FITC de tamaño 70kDa fue añadido a la parte superior de la cámara de permeabilidad, manteniendo medio EGM-2 sin dextranos en la parte inferior. La fluorescencia en la parte inferior de la cámara fue medida a diferentes tiempos (10, 20, 30 y 60 minutos) en un lector de fluorescencia en placa (STORM 820 GE Health Care) con longitud de onda de excitación a 485nm y de emisión a 538nm.

## 9. Microscopía electrónica de transmisión

Las aortas de ratones sacrificados y posteriormente perfundidos desde el ventrículo izquierdo con 10ml de PBS 1x, seguidos de 10ml de Formaldehído 4 %, fueron extraídas y fijadas a continuación en Glutaraldehído 3% durante 24 horas. Fragmentos de AoAbd fueron embebidos en resina tipo Epon (Sigma Aldrich, 44610) y posteriormente cortados en secciones ultrafinas. Las secciones fueron contrastadas con marcaje con citrato de plomo y citrato de uranilo, visualizadas con un microscopio electrónico de transmisión (Jeol Jem 1010, 80 kV, Jeol Ltd. Tokyo, Japón) y fotografiadas con una cámara Gatan (Orius, SC200, Pleasanton, California) a magnificaciones de 6000x y 12000x.

## 10. Análisis histológico

### 10.1. Procesamiento de tejidos

Los órganos de los animales sacrificados y perfundidos fueron fijadas con 4% de PFA durante 24h a 4°C. Posteriormente, estos órganos fueron deshidratados e inmersos en moldes de parafina antes de ser cortados en secciones transversales de 5µm en un micrótopo (Jung RM2055 Leica) para su tinción posterior. Alternativamente, para los experimentos de permeabilidad con dextranos *in vivo*, los tejidos frescos fueron embebidos en OCT y conservados a -80°C. Las crio-secciones de 7µm fueron realizadas con un criostato Leica CM1950.

### 10.2. Inmunohistoquímicas e inmunofluorescencias

Las secciones de parafina fueron tratadas con soluciones decrecientes de etanol, para desparafinar y rehidratar los tejidos, e incubadas en solución de citrato (10mM de citrato sódico; pH 6,0) durante 3 min a 121°C para desenmascarar los epítomos. Transcurrido este tiempo, fueron incubadas con solución de bloqueo (PBS 1x con 10% de suero de cabra, 2% de BSA y bloqueo contra la fracción constante de inmunoglobulinas de ratón (Fc)) durante 60 minutos. Finalmente, fueron incubadas en solución de incubación (PBS 1x con 10% de suero de cabra, 2% de BSA) con los anticuerpos primarios durante toda la noche (Tabla 6). Para la inmunohistoquímica (IHQ), las secciones se incubaron con el anticuerpo primario anti-Ki67, y posteriormente con un anticuerpo secundario biotinilado. La detección del color de la IHQ se realizó con DAB (Vector Laboratories) durante 10 minutos como tiempo máximo. Posteriormente, las secciones fueron contrateñidas con hematoxilina, nuevamente deshidratadas y montadas con DPX (CasaÁlvarez, 10-8500). La especificidad de los anticuerpos fue comprobada en cada experimento usando controles negativos por sustitución del anticuerpo primario con su correspondiente IgG inespecífica. Las imágenes fueron adquiridas usando un microscopio Leica DM2500 con objetivos de 20x y 40x HCX PL Fluotar y usando el programa Leica Application Suite V3.5.0.

En el caso de las inmunofluorescencias (IF), los anticuerpos secundarios que se utilizaron se muestran en la Tabla 6. El análisis de apoptosis se llevó a cabo mediante tinción con ApopTag (TdT enzyme kit). Las muestras de IF fueron montadas con DAPI (1:1000) en medio de montaje Citifluor AF4 (Aname, 17973) y las imágenes (1024 x 1024 pixeles o 2048x2048, 8-bits o 16-bits) fueron adquiridas a temperatura ambiente con un microscopio confocal invertido Nikon A1R, usando el programa Nikon-NIS-Elements, o un microscopio Zeiss LSM 700, usando el programa ZEN. Las imágenes se analizaron en el programa ImageJ y se procesaron para presentación con Adobe Illustrator.

### 10.3. Detección directa de fluorescencia en experimentos de permeabilidad

Las muestras procedentes de los experimentos de permeabilidad *in vivo* fueron procesadas en fresco en OCT, como se indica en el apartado 10.1, y cortadas en secciones de 7µm con un criostato Leica CM1950. Las muestras fueron montadas con medio de montaje Citifluor AF4 (Aname, 17973) y la fluorescencia se detectó directamente en un microscopio confocal invertido (Nikon A1R), con láser de excitación a 555nm y detección de emisión a 500-610nm para RhodB y láser de excitación a 488nm, con detección de emisión a 505-600nm para FITC.

Para la cuantificación de la señal de dextranos acumulados se utilizó el programa ImageJ, donde se separaron los canales correspondientes a cada fluoróforo y se cuantificó la intensidad de fluorescencia (u.a.) en el área de la pared aórtica previamente seleccionada. Se cuantificaron 3 secciones separadas 25µm por cada lesión.

Anticuerpo	Casa comercial	Dilución	Especie
<b>anti-p-MLC</b>	Cell Signaling	1/100	Conejo policlonal
<b>anti-SMA-Cy3</b>	Sigma-Aldrich	1/300	Ratón monoclonal
<b>anti-Cd31</b>	Abcam	1/50	Conejo policlonal
<b>anti-Cd31</b>	Millipore	1/100	Hamster policlonal
<b>Anti-Ki67</b>	Millipore	1/200	Conejo policlonal
<b>anti-IgG Hamster 647</b>	Jackson	1/500	Cabra
<b>anti-IgG Conejo 647</b>	Thermo Fisher	1/500	Cabra

Tabla 6. Anticuerpos utilizados para IF o IHQ y sus diluciones.

### 10.4. Tinción de tejido fresco *whole mount*

Los animales sacrificados fueron perfundidos con suero salino y posteriormente con 4% de PFA. Las aortas se abrieron longitudinalmente y se inmovilizaron en una placa Petri recubierta con gelatina con ayuda de pequeñas agujas. En esa posición fueron fijadas con 4% PFA durante 24h a 4°C. El tejido fue permeabilizado y bloqueado durante 1h (PBS 1x 0,3% Tx-100 con 10% suero de cabra, 2% BSA y bloqueo contra la Fc de ratón). Finalmente, fueron incubadas con anti Cd31 durante toda la noche a temperatura ambiente en solución de incubación (PBS 1x 0,3% Tx-100 con 10% suero de cabra, 2% BSA). Tras lavar 3 veces con PBS 1x se incubaron con el anticuerpo secundario (anti-IgG de hámster 647, Jackson Immunoresearch, 127-605-160) en solución de incubación durante 24 horas a temperatura ambiente.

## 10.5. Tinciones de tejidos con colorantes

### 10.5.1. Tricrómico de Masson (T. Masson)

Las secciones de aorta embebidas en parafina fueron desparafinadas antes de la tinción. Se utilizaron cuatro colorantes siguiendo las instrucciones del kit (Merck, 100485): Hematoxilina de Weigert (5 min, azul, tinción de núcleos), Azofloxina (10-12 min, rojo, tinción de citoplasma y músculo), ácido fosfotungstácico (1 min, naranja, eritrocitos), verde luz (7 min, verde, tejido conectivo colágeno). Las secciones fueron nuevamente deshidratadas y montadas con DPX.

### 10.5.2. Hematoxilina y Eosina (HE)

Las secciones tisulares desparafinadas fueron teñidas según las instrucciones del fabricante (Sigma Aldrich, HT1079) con hematoxilina de Harris durante 3 min, lavadas dos veces en agua destilada e incubadas con eosina (95% de etanol, 5% de eosina) durante 5 minutos. Las secciones fueron nuevamente deshidratadas y montadas con DPX.

### 10.5.3. Elásticas de Van Gieson (EVG)

Las secciones desparafinadas fueron teñidas usando el kit (Sigma Aldrich, HT25A) con Hematoxilina de Weigert durante 10 minutos, lavadas en agua destilada e incubadas con la solución de Van Gieson (Fucsina acida y ácido pícrico) durante 30-60 segundos. Las secciones fueron nuevamente deshidratadas y montadas con DPX.

## 11. Extracción de ácidos nucleicos y PCR cuantitativa

Los extractos de ARN total de células se lisaron utilizando el reactivo Tripure (Roche, 1667165001). Para los extractos de ARN de tejido, estos se congelaron en nitrógeno líquido y se trituraron con ayuda de un mortero. El polvo se disolvió en Tripure y se disgregó con el equipo MagNALyser (Roche). Una vez obtenidos los lisados, se continuó la extracción acorde con las instrucciones de fabricante para el reactivo Tripure. La cantidad de ARN obtenida fue cuantificada en el Nanodrop y 2µg de ARN fueron sometidos a transcripción reversa a 37°C durante 50 min en una reacción de 20µl de volumen que contenía: 200 unidades de la transcriptasa reversa MML-V (MMLV Moloney murine leukemia virus, Promega, #9PIM170), 100ng de oligonucleótidos aleatorios y 40 unidades de inhibidor de RNAsas (Life Technologies). La PCR cuantitativa a tiempo real se llevó a cabo con 50ng de ADNc utilizando el sistema de análisis de expresión génica SYBR Green (Applied Biosystems, 43-091-55) y siguiendo las instrucciones de la casa comercial, usando el termociclador ABI Prism 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Los oligonucleótidos utilizados se indican en la Tabla 7. Como

controles internos se utilizaron los genes *Gapdh* y *Hprt*. La cantidad de ARNm de las muestras fue normalizada con un control interno y con el control del experimento y estimada por el método de cuantificación relativa de  $2^{-\Delta CT}$ .

Nombre	Secuencia	Gen diana
<b>Acta2 Fw</b>	GTGACCACAGCTGAACGTG	<i>Acta2</i>
<b>Acta2 Rv</b>	CCAGGGAGGAGGAAGAGG	<i>Acta2</i>
<b>Myh11 Fw</b>	GCCAATATTGAAACATATCTTCTGG	<i>Myh11</i>
<b>Myh11 Rv</b>	CGGCGAGCAGGTAGTAGAAG	<i>Myh11</i>
<b>Cnn1 Fw</b>	AACTTCATGGATGGCCTCAA	<i>Cnn1</i>
<b>Cnn1 Rv</b>	ACCCGGCTGCAGCTTGT	<i>Cnn1</i>
<b>Th Fw</b>	ACGTCCCCAAGGTTTCATC	<i>Th</i>
<b>Th Rv</b>	TACAGCCCCGAGACAAGGA	<i>Th</i>
<b>Ddc Fw</b>	TAGCTGACTATCTGGATGGCAT	<i>Ddc</i>
<b>Ddc Rv</b>	GTCCTCGTATGTTTCTGGCTC	<i>Ddc</i>
<b>Dbh Fw</b>	GAGGCGGCTTCCATGTACG	<i>Dbh</i>
<b>Dbh Rv</b>	TCCAGGGGGATGTGGTAGG	<i>Dbh</i>
<b>Pnmt Fw</b>	CAGACCTGAAGCACGCTACAG	<i>Pnmt</i>
<b>Pnmt Rv</b>	TAGTTGTTGCGGAGATAGGCG	<i>Pnmt</i>
<b>Phox2a Fw</b>	CTGGAGGCTTCCAATACAGTCC	<i>Phox2a</i>
<b>Phox2a Rv</b>	GGAAGTCCGAGTAGGGTG	<i>Phox2a</i>
<b>Phox2b Fw</b>	GGGCTAAGTTTCGCAAGCAG	<i>Phox2b</i>
<b>Phox2b Rv</b>	CAGTGCTGTCGGGATCAGTG	<i>Phox2b</i>
<b>Npy Fw</b>	ATGCTAGGTAACAAGCGAATGG	<i>Npy</i>
<b>Npy Rv</b>	TGTCGCAGAGCGGAGTAGTAT	<i>Npy</i>
<b>Hprt Fw</b>	GCTGGTGAAGGACCTCT	<i>Hprt</i>
<b>Hprt Rv</b>	CACAGGACTAGAACACCTGC	<i>Hprt</i>
<b>Gapdh Fw</b>	TGCACCACCAACTGCTTAGC	<i>Gapdh</i>
<b>Gapdh Rv</b>	GGCATGGACTGTGGTCATGAG	<i>Gapdh</i>

Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados para PCR cuantitativa.

## 12. Ensayo de secuenciación de ARN para identificación de genes diferencialmente expresados (GDE) por RNAseq

Las aortas fueron extraídas y se eliminó la grasa perivascular y la capa adventicia tanto como fue posible con unas pinzas quirúrgicas. El ARN total fue extraído con Tripure y se limpió de residuos y solventes mediante el kit de limpieza de ARN RNeasy MinElute Cleanup Kit (QIAGEN, 74204). La calidad y limpieza del ARN se analizó mediante absorbancia en Nanodrop y mediante Bioanalyzer (Agilent Bioanalyzer RNA NanoChip). Sólo se utilizaron muestras con relaciones de absorbancia 260/280 > 2,0; 230/260 en un rango entre 2,0-2,2 y muestras con RIN (*RNA Integrity number- Bioanalyzer*) mayores de 7. De cada muestra se reservaron 2µg para

posterior reacción de retro-transcriptasa y validación por PCR cuantitativa. Para el estudio de secuenciación, se prepararon muestras mezcla del ARN de tres animales de cada condición, por triplicado para cada condición (9 aortas en total por condición). Se analizaron las siguientes condiciones: *Rcan1<sup>+/+</sup>*, *SM-Rcan1<sup>-/-</sup>* y *EC-Rcan1<sup>-/-</sup>* en condiciones basales y *Rcan1<sup>+/+</sup>*, *SM-Rcan1<sup>-/-</sup>* y *EC-Rcan1<sup>-/-</sup>* tras infusión con Ang-II durante 6 horas. Para cada muestra se utilizaron 1,5µg de ARN para la conversión a ADNc mediante la reacción de la retro-transcriptasa usando oligonucleótidos dT para seleccionar el ARNm. Los ADNc de cadena sencilla generados se usaron para generar una librería mediante adaptadores y facilitar su amplificación. Partiendo de la librería, los ADNc se secuenciaron según la tecnología Illumina (Illumina Genome Analyzer IIx System). La generación de la librería y la secuenciación masiva fueron realizados en el CNIC por las unidades técnicas especializadas.

### 13. Inmunoprecipitación (IP)

Los cerebros de los ratones *Rcan1<sup>+/+</sup>* o *Rcan1<sup>-/-</sup>* fueron extraídos e inmediatamente congelados en nitrógeno líquido. Posteriormente, el tejido fue pulverizado con ayuda de un mortero, homogenizado y lisado en tampón de lisis (50mM de HEPES pH 7,5; 50mM de NaF; 2mM de  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ; 30mM de pirofosfato sódico; 150mM de NaCl y 1% de NP-40) suplementado con 1mM de fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF), 100µM de benzamidina, 1µg/ml de pepstatina, 1µg/ml de leupeptina y 1µg/ml de aprotinina. Las CMLVs se lisaron con tampón de lisis a 4°C directamente sobre la placa con ayuda de un rascador. La concentración de los extractos de proteína fue medida mediante ensayo de Bradford (Biorad, 500001) y posteriormente ajustada a 5 mg/ml con tampón de lisis. La inmunoprecipitación se llevó a cabo con el kit Pierce Co-Immunoprecipitation (Thermo Fisher, 26149). El extracto proteico (5mg) fue sometido a un lavado incubándolo 30 minutos a temperatura ambiente con la resina del kit sin anticuerpo. Posteriormente se incubó el extracto pre-lavado con 100µl de resina previamente conjugada con 1 mg de anticuerpo anti-Rcan1 (Sigma Aldrich, D6694) o anticuerpo control (IgG de conejo, Santa Cruz, sc-2027) durante la noche a 4°C. La resina fue lavada 3 veces con el tampón de lisis, y otras 5 veces con tampón de lavado (igual al de lisis pero con cantidades decrecientes de NP-40: 0,5%, 0,1%, 0,05% y 0%). Por último, las proteínas inmunoprecipitadas se eluyeron con el tampón de elución del kit. Los datos crudos están disponibles en la base de datos PeptideAtlas (<http://www.peptideatlas.org/PASS/PASS01228>) y en los archivos suplementarios.

### 14. Immunoblot

Las muestras de tejido aórtico fueron congeladas en nitrógeno líquido, guardadas a -80°C, hasta que fueron trituradas con el mortero, lisadas en tampón de lisis (10mM de Tris-HCl

## Materiales y Métodos

pH 7,5; 1% de Triton X-100; 1% de dioxiclurato de sodio; 0,1% de SDS; 150mM de NaCl y 5mM de EDTA, suplementado con 1 $\mu$ M de ditioneitol, 1mM de fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF), 10mM de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 100 $\mu$ M de benzamidina, 1 $\mu$ g/ml de pepstatina, 1 $\mu$ g/ml de leupeptina y 1 $\mu$ g/ml de aprotinina, y homogenizadas en un equipo MagNALyser (Roche).

Las células en cultivo fueron despegadas de sus placas, lavadas con PBS 1x frío y congeladas a -80°C antes de ser lisadas con un tampón de lisis: 20mM de HEPES pH 7,6; 400mM de NaCl; 1mM de EDTA; 3mM de EGTA; 1 $\mu$ M de DTT; 1mM de PMSF; 10mM de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>; 100 $\mu$ M de benzamidina; 1 $\mu$ g/ml de pepstatina; 1 $\mu$ g/ml de aprotinina; 1 $\mu$ g/ml de leupeptina y 1% de Triton X-100.

Los lisados celulares y de tejido se incubaron en rotación a 4°C durante 20 min antes de ser centrifugados (16000 rfc) a 4°C durante 15 min. La fracción soluble (sobrenadante) se transfirió a un nuevo tubo y se cuantificó por la técnica de Bradford (Bio Rad). Posteriormente, se prepararon las muestras con 30 $\mu$ g de proteína en tampón de carga Laemmli (concentración final de 60mM Tris-Cl pH 6,8; 2% SDS; 10% glicerol; 5%  $\beta$ -mercaptoetanol y 0,01% azul de bromofenol) y se incubaron durante 10 min a 100°C. Los extractos obtenidos se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). Las proteínas presentes en estos geles se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa mediante la aplicación de un corriente eléctrica continua en presencia del tampón de transferencia (Tris 25mM, glicina 192mM, metanol 10%). Las membranas se lavaron con tampón Tris-HCl pH 7,5 con detergente Tween 20 al 0,05% (TBS-T) y se incubaron durante 30 min con una solución de leche desnatada y deshidratada en polvo al 5% en TBS-T. Tras 3 lavados con TBS-T, las membranas se incubaron durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios preparados en TBS-T suplementado con 2% de BSA y 0,1% de azida sódica. En el caso del anticuerpo de Rcan1, el anticuerpo fue preparado en TBS-T con 3% de leche desnatada y deshidratada y 0,1% de azida sódica. Tras la incubación con los anticuerpos primarios (Tabla 8), las membranas se lavaron 3 veces con TBS-T y se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa a dilución 1:5000 (anti-ratón o anti-conejo, Pierce) durante 1h. Por último, las membranas se lavaron con TBS-T y se incubaron con el reactivo ECL (Enhanced Chemiluminescence, Amersham, 28980926) para detectar las proteínas reconocidas por los anticuerpos.

Anticuerpo	Casa comercial	Dilución	Especie
anti-p-MLC	Cell Signaling	1/1000	Conejo policlonal
anti-Rcan1	Sigma-Aldrich	1/1000	Conejo policlonal
anti- $\beta$ -catenina	BD Transduction Laboratories	1/1000	Ratón monoclonal
anti-Gsk-3 $\beta$	BD Biosciences	1/1000	Ratón monoclonal
anti-Tubulina	Sigma-Aldrich	1/40000	Ratón monoclonal
anti-Gapdh	Abcam	1/10000	Ratón monoclonal

Tabla 8. Anticuerpos utilizados para *immunoblot* y sus diluciones.

En el caso de los *immunoblots* procedentes de inmunoprecipitaciones, se utilizó un 25% del volumen eluido, al cual se le añadió la cantidad correspondiente de tampón de carga. Se utilizó un 2-3% del volumen del extracto inicial (*input*) para comparar con el inmunoprecipitado.

## 15. Análisis proteómico

El análisis proteómico se realizó sobre productos de inmunoprecipitación de extractos proteicos de cerebro de ratón. Aproximadamente 1/3 del eluido de la IP fue fraccionado en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), el gel fue teñido con azul de Coomassie (0,3% de Coomassie, 40% de metanol, 10% de ácido acético en agua) y las bandas del gel recortadas y digeridas con tripsina. La suspensión de péptidos obtenidos se separó y analizó mediante cromatografía líquida acoplada a un equipo MALDI-TOF para la identificación y cuantificación de proteínas<sup>178</sup>. La identificación de los péptidos mediante su valor MS/MS se realizó mediante el método de probabilidad<sup>179</sup>. La tasa de falsos descubrimientos (FDR) se calculó mediante el método de refinamiento y se estableció en 1% para la identificación de proteínas interactoras específicas<sup>180,181</sup>. Los datos crudos están disponibles en PeptideAtlas (<http://www.peptideatlas.org/PASS/PASS01228>) y adjuntados en el CD como material suplementario. El análisis de los datos fue realizado en colaboración con el servicio de proteómica del CNIC.

## 16. Análisis estadístico

Para el cálculo de todos los análisis estadísticos se utilizó el *software* GraphPad Prism7. Los datos representados son las medias aritméticas ( $\pm$  el error estándar (s.e.m.)) correspondientes a un mínimo de 3 experimentos. El estudio estadístico se realizó mediante el análisis de la varianza *one-way* ANOVA seguido de un post-test de Tukey para los experimentos de más de 3 grupos; el análisis de varianza *two-way* ANOVA seguido de un post-test de Tukey para experimentos con más de 2 grupos y más de 2 condiciones o tratamientos o tiempos diferentes; o mediante el estudio de t de Student para comparar únicamente dos condiciones; todo ello siempre en función de lo más apropiado para los datos. Para los resultados de incidencias expresados en tantos por cien, se calculó el p-valor según la distribución Chi cuadrada, considerando los números de animales afectados y no afectados y el tamaño total de la muestra, según recomendado anteriormente<sup>182</sup>. Para los estudios de cuantificación del área de la hemorragia, se consideró cada HIM como evento separado para cuantificar el área en cada caso, incluso en los casos en los que un solo animal presentase varias lesiones. Para los estudios de mortalidad representados como curvas de supervivencia, se usó el Test Log-rank o Test de Mantel-Cox. Las diferencias se consideraron significativas a partir de  $p < 0,05$  (\*\*\*\* $p < 0,0001$ ;

## Materiales y Métodos

---

\*\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$ ). El asterisco (\*) siempre indica comparación con la situación control, basal o fenotipo silvestre. Cuando el análisis estadístico se extiende a otros grupos se han utilizado otros símbolos: #, comparado con animales *SM-Rcan1<sup>-/-</sup>*; &, comparado con animales *EC-Rcan1<sup>-/-</sup>*; y \$, comparado con animales *Ubc-Rcan1<sup>-/-</sup>*. Todos los grupos de animales usados estaban equilibrados en sexo, edad y peso.

# Resultados



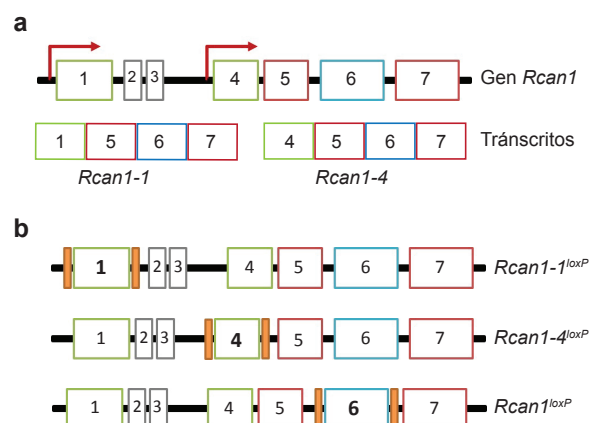


## Generación de ratones modificados genéticamente para la delección inducible de *Rcan1*

Hasta la fecha, las líneas de ratón deficientes en *Rcan1* descritas no permitían el estudio en tejidos específicos por separado, ya que se basaban en el bloqueo completo del gen de *Rcan1* en el exón 6, dando como resultado ratones deficientes en ambas isoformas de *Rcan1* en todos los tejidos y desde el desarrollo. Para hacer nuestro estudio selectivo para las isoformas de *Rcan1* y para el tipo celular, generamos por primera vez líneas de ratón *knockout* condicionales de tejido e inducibles por tamoxifeno, en tres regiones del *locus* de *Rcan1* mediante el sistema Cre-lox<sup>166</sup>.

### 1. Las construcciones genéticas son diseñadas mediante la inserción de sitios loxP en el gen diana y la recombinación controlada por ratones que expresan Cre<sup>ERT2</sup> en tejidos específicos

Para estudiar el papel específico de cada isoforma de *Rcan1*, generamos ratones transgénicos para la delección inducible de cada isoforma específicamente. Mediante recombinación homóloga, flanqueamos los exones 1, 4 y 6 con sitios loxP de reconocimiento por la recombinasa Cre (Fig. 16a-16b). La correcta inserción de la construcción génica se validó por *southern blot* para los 3 exones modificados (Fig. 17a-17c). Los ratones con las secuencias loxP flanqueando el exón 1, exón 4 o exón 6 se cruzaron en cada caso con ratones transgénicos que expresaban la recombinasa Cre fusionada al receptor de estrógenos modificado (Cre<sup>ERT2</sup>) para restringir su actividad a la inducción con tamoxifeno. Para las 3 modificaciones en el gen de *Rcan1* se cruzaron con animales que expresaban Cre<sup>ERT2</sup> específicamente en células de músculo liso (*Myh11Cre<sup>ERT2</sup>*) o en CEs (*Cdh5Cre<sup>ERT2</sup>*). En el único caso del exón 6, también se utilizó el promotor *Ubc* como control de delección ubicua inducible (*UbcCre<sup>ERT2</sup>*). Además, se usaron ratones *Rosa26-LSL-YFP* (*R26-YFP<sup>LSL</sup>*) y *Rosa26-LSL-Tomato* (*R26-Tomato<sup>LSL</sup>*) para detectar la actividad de la recombinasa Cre, en combinación con ratones *Myh11-Cre<sup>ERT2</sup>* y *Cdh5-Cre<sup>ERT2</sup>*, respectivamente.



**Figura 16. Esquem del gen *Rcan1* destacando los exones diana. (a)** Diagrama de *Rcan1* mostrando promotores (flechas rojas), exones (cajas) y transcritos. **(b)** Diagrama de *Rcan1* mostrando los exones diana flanqueados por sitios loxP (cajas naranjas).

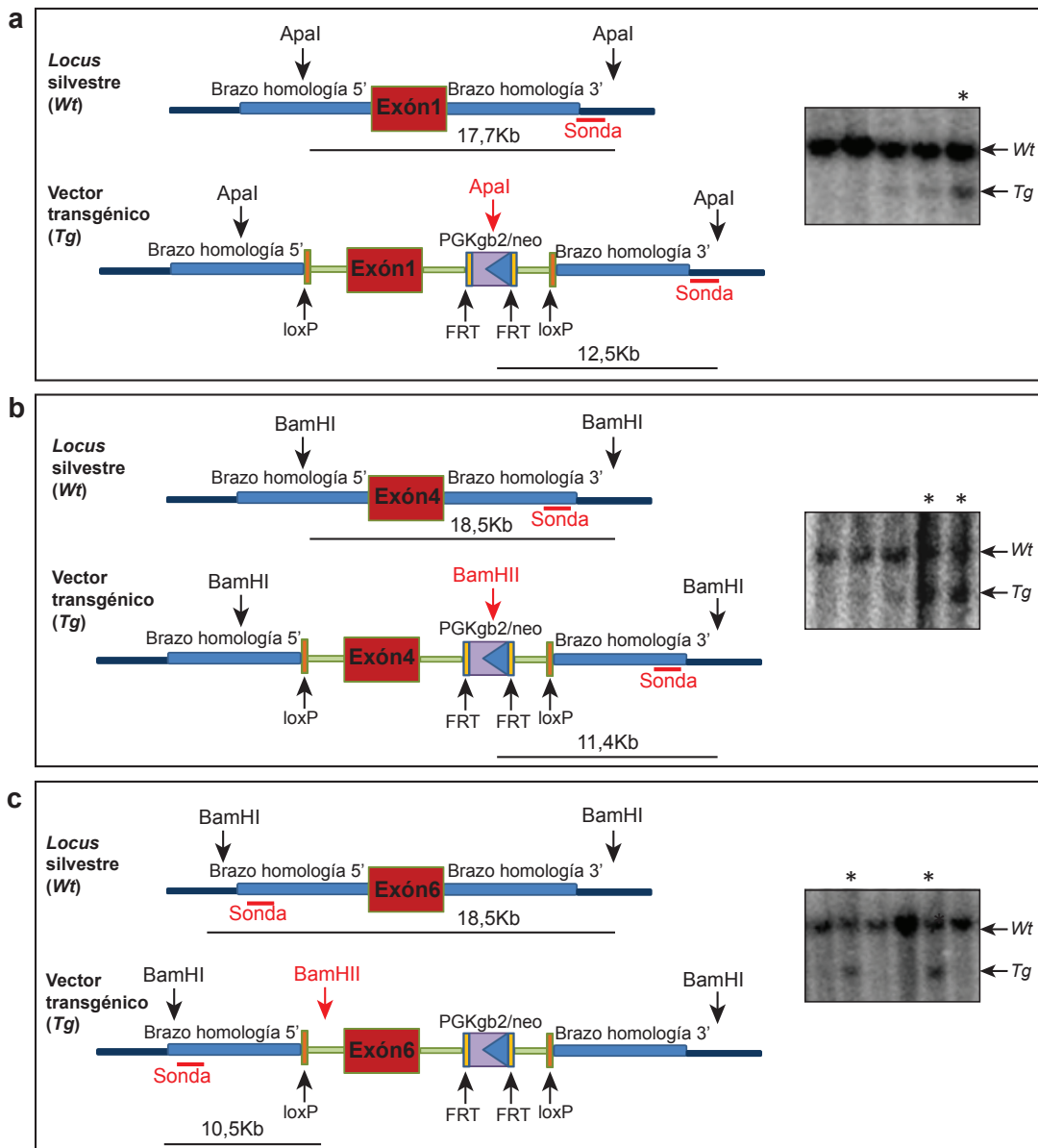


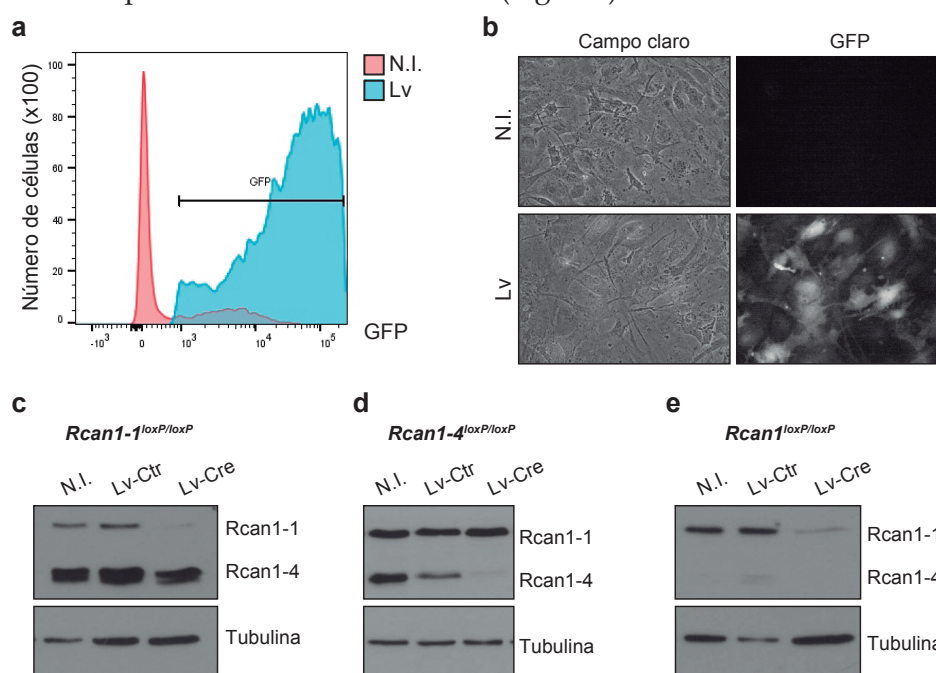
Figura 17. La correcta inserción de los transgenes en el locus *Rcan1* fue verificada por *southern blot*. Estrategia e imágenes representativas de *southern blot* para cada exón diana de *Rcan1*. Las construcciones génicas incluyen sitios diana para enzimas de restricción que permite diferenciarlas de la secuencia silvestre por digestión enzimática. ADNg fue extraído y digerido con *Apal* o *BamHI*, los fragmentos obtenidos se separaron mediante electroforesis y se hibridaron con sondas marcadas radiactivamente. La estrategia fue similar para el Exón1 (a), el Exón4 (b) y el Exón6 (c). Los asteriscos indican clones positivos para la inserción del transgén (Tg).

## 2. La actividad de la recombinasa Cre induce la delección en los ratones modificados genéticamente

### 2.1. CMLVs obtenidas de los ratones modificados genéticamente presentan la delección en el gen *Rcan1* mediada por la recombinasa Cre

En primer lugar, y antes de proceder con experimentos con animales, evaluamos la capacidad de los sitios loxP introducidos en el gen *Rcan1* para recombinar en presencia de la recombinasa Cre. Aislamos CMLVs de los animales con los exones 1, 4 o 6 del gen *Rcan1*

flanqueados por sitios loxP, pero carentes del transgén Cre<sup>ERT2</sup>, y las infectamos con lentivirus codificantes de la recombinasa Cre o de proteína verde fluorescente (GFP). Monitorizamos el porcentaje de células transducidas mediante citometría de flujo y observamos que más del 80% de las células estaban infectadas y expresaban altos niveles de GFP (Fig. 18a-18b). Las CMLVs fueron tratadas con Ang-II durante 2 horas para inducir la expresión de la isoforma Rcan1-4 y así comprobar su correcta delección. Se observó que: células procedentes de animales con la modificación en el exón 1 (*Rcan1-1<sup>loxP/loxP</sup>*) presentaban reducción en la expresión de la isoforma Rcan1-1 (Fig. 18c); células procedentes de animales con la modificación en el exón 4 (*Rcan1-4<sup>loxP/loxP</sup>*) presentaban reducción en la expresión de la isoforma Rcan1-4 (Fig. 18d); y células procedentes de animales con la modificación en el exón 6 (*Rcan1<sup>loxP/loxP</sup>*) presentaban reducción en la expresión de las dos isoformas (Fig. 18e).



**Figura 18.** Las construcciones génicas insertadas en el locus de *Rcan1* recombinan específicamente en presencia de la recombinasa Cre. (a) Expresión de GFP analizada por citometría de flujo en CMLVs infectadas con vectores lentivirales codificantes de GFP (Lv) y no infectadas (N.I.). (b) Imágenes representativas de CMLVs eficientemente infectadas en (a). (c-e) *Immunoblots* representativos de la expresión de Rcan1 en CMLVs aisladas de animales (c) *Rcan1-1<sup>loxP/loxP</sup>* (n=2), (d) *Rcan1-4<sup>loxP/loxP</sup>* (n=3) y (e) *Rcan1<sup>loxP/loxP</sup>* (n=3) e infectadas con lentivirus codificantes de la recombinasa Cre (Lv-Cre) o GFP (Lv-Ctr). N.I., no infectado.

## 2.2. La delección en las isoformas de *Rcan1* es detectada en músculo liso o endotelio tras la administración del inductor tamoxifeno

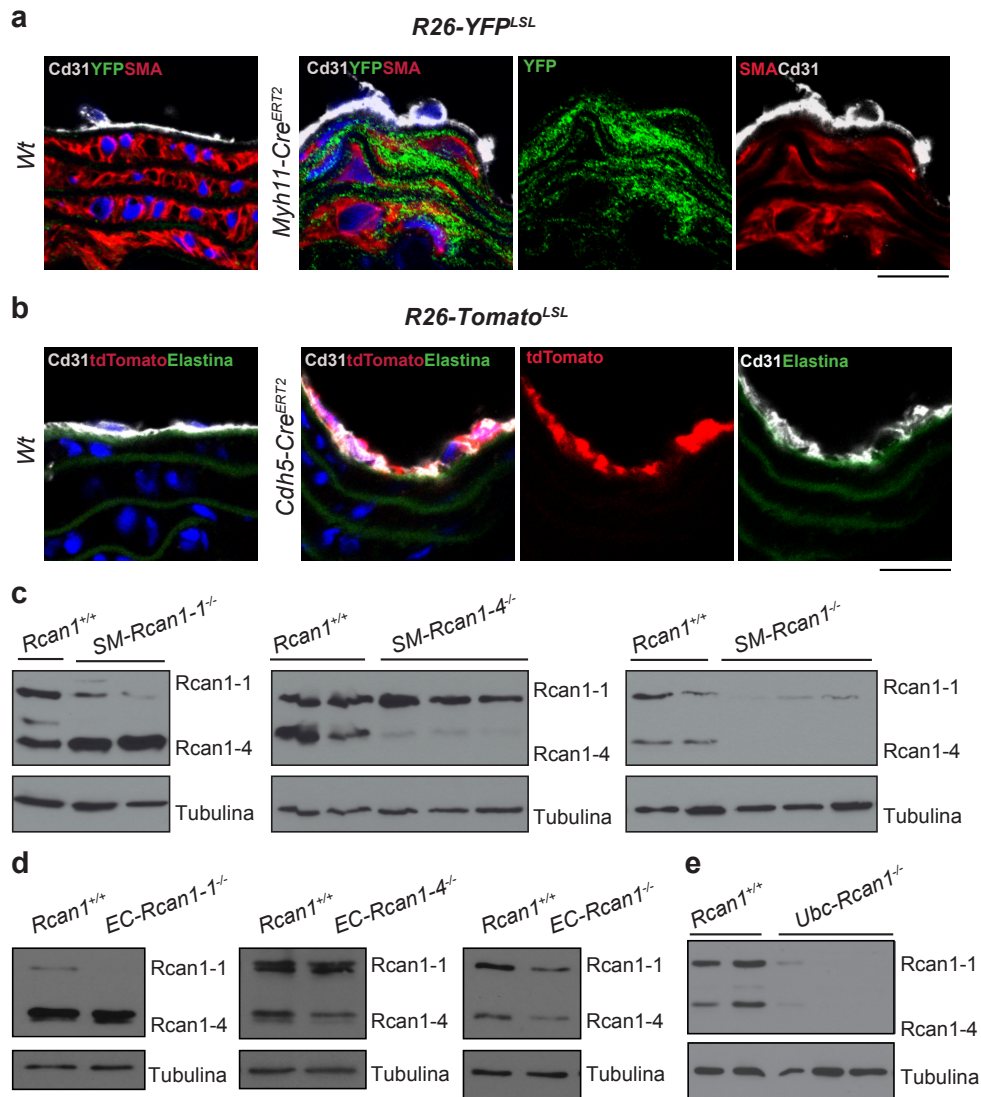
Para comprobar la localización de la expresión de la recombinasa Cre condicional de tejido y su actividad, utilizamos animales "reporters" con una inserción en el locus *Rosa26* (*R26*) de una proteína fluorescente (YFP o tdTomato) precedida por una región de parada (*STOP*) flanqueada por sitios loxP (*LSL*), de manera que en condiciones normales la proteína fluorescente no se expresa, pero lo hace en presencia de Cre en el núcleo celular. Combinamos el

## Resultados

reportero *R26-YFP<sup>LSL</sup>* con la expresión de *Cre<sup>ERT2</sup>* en músculo liso (*Myh11-Cre<sup>ERT2</sup>*) y el reportero *R26-Tomato<sup>LSL</sup>* con la expresión de *Cre* en el endotelio (*Cdh5-Cre<sup>ERT2</sup>*). Tras la administración de tamoxifeno, observamos la correspondiente expresión de proteína YFP en las CMLVs, co-localizando con la expresión de actina de músculo liso (SMA), pero no con la de Cd31, empleado como marcaje endotelial (Fig. 19a). De forma correspondiente, detectamos la expresión de proteína fluorescente tdTomato en la monocapa endotelial de la aorta, co-localizando con el marcador endotelial Cd31, al tiempo que no se detectaba en la zona de la media, caracterizada por la auto-fluorescencia de las capas de elastina (Fig. 19b).

Animales de las 7 líneas inducibles generados fueron inyectados con tamoxifeno para comprobar la delección de las isoformas correspondientes en el tejido específico. Todos ellos fueron tratados con Ang-II durante 1 día para activar la expresión de la isoforma inducible Rcan1-4. En experimentos de *immunoblot* con extractos totales de aorta se confirmó una disminución de la expresión de Rcan1-1 en el caso de animales *SM-Rcan1-1<sup>-/-</sup>*, de Rcan1-4 en los ratones *SM-Rcan1-4<sup>-/-</sup>* y de las dos isoformas en el caso de *SM-Rcan1<sup>-/-</sup>* (Fig. 19c). La disminución de Rcan1 detectada en aortas en estos animales no es total, posiblemente debida a la presencia de células endoteliales y de la adventicia. Para el análisis de las líneas condicionales de endotelio (EC), se prepararon cultivos celulares enriquecidos en CEs de pulmón mediante el uso de bolas magnéticas acopladas al anticuerpo anti-ICAM-2. Las células fueron amplificadas en cultivo y posteriormente se estudió la eficiencia de delección mediante *immunoblot*. Se consiguió detectar buena disminución en los tres casos: reducción de Rcan1-1 en animales *EC-Rcan1-1<sup>-/-</sup>*, de Rcan1-4 en *EC-Rcan1-4<sup>-/-</sup>* y de ambas isoformas en *EC-Rcan1<sup>-/-</sup>* (Fig. 19d). De nuevo, la reducción de cada isoforma de Rcan1 no fue total, debido a la dificultad de obtener cultivos de CEs completamente puros, sin presencia de otros tipos celulares. El mismo proceso fue llevado a cabo con el modelo de delección inducible y ubicua, donde se utilizaron muestras de aorta total. Los resultados obtenidos mostraron que la línea *Ubc-Rcan1<sup>-/-</sup>* presentaba una ausencia casi total de Rcan1 en aorta (Fig. 19e).

Asimismo, ratones deficientes en Rcan1 fueron analizados en condiciones basales. No se observó ningún cambio evidente en el peso corporal (Fig. 20a), frecuencia cardíaca (Fig. 20b) y PA (Fig. 20c-20d) de ratones *SM-Rcan1<sup>-/-</sup>* y *Rcan1<sup>+/+</sup>*. Además, se comparó la morfología de la pared vascular aórtica de ratones *Rcan1<sup>+/+</sup>*, *Rcan1<sup>-/-</sup>*, *Ubc-Rcan1<sup>-/-</sup>*, *SM-Rcan1<sup>-/-</sup>*, *SM-Rcan1-1<sup>-/-</sup>*, *SM-Rcan1-4<sup>-/-</sup>*, *EC-Rcan1<sup>-/-</sup>*, *EC-Rcan1-1<sup>-/-</sup>* y *EC-Rcan1-4<sup>-/-</sup>* y no se detectaron alteraciones en la estructura de la pared, número de capas de elásticas o morfología celular (Fig. 20e). No existían datos previos del papel de Rcan1 en la homeostasis basal del vaso, sino únicamente en condiciones patológicas<sup>82,155</sup>. Para estudiar la contribución de Rcan1 al remodelado vascular estudiamos dos modelos de patología vascular: (1) modelo de hipertensión por infusión de Ang-II y (2) modelo de formación de neoíntima por ligación de carótida.

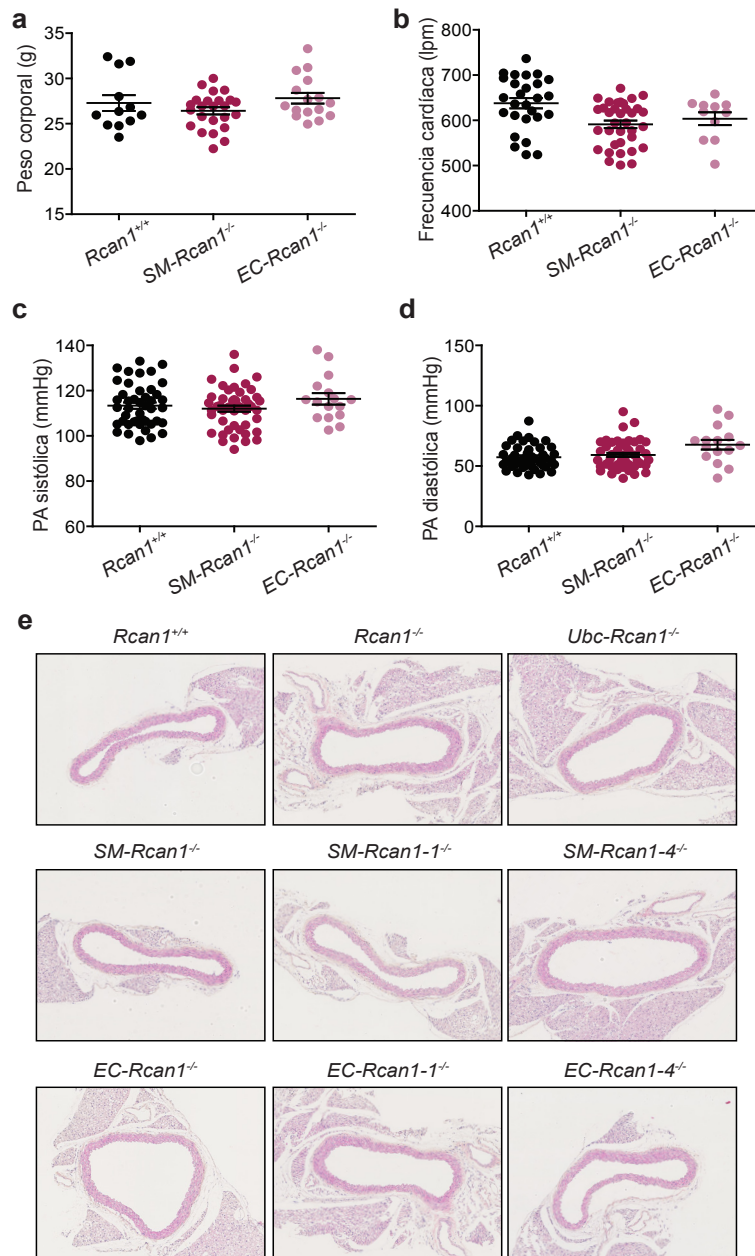


**Figura 19. Comprobación de la recombinación específica de tejido *in vivo*.** (a) Imágenes representativas de la fluorescencia de YFP (verde) y DAPI (azul) e inmunofluorescencia de SMA (rojo) y Cd31 (gris) en secciones aórticas de ratones de genotipo silvestre (*Wt*) y *Myh11Cre<sup>ERT2</sup>;R26-YFP<sup>LSL</sup>* ( $n=4$  en cada genotipo). Escala, 20  $\mu\text{m}$ . (b) Imágenes representativas de la fluorescencia de tdTomato (rojo), elastina (verde) y DAPI (azul) e inmunofluorescencia de Cd31 (gris) en secciones aórticas de ratones de genotipo silvestre (*Wt*) y *Cdh5Cre<sup>ERT2</sup>;R26-Tomato<sup>LSL</sup>* ( $n=4$  en cada genotipo). Escala, 20  $\mu\text{m}$ . (c) *Inmunoblots* representativos de Rcan1 y tubulina (control de carga) de aortas de animales (c) *SM-Rcan1-1<sup>-/-</sup>*, *SM-Rcan1-4<sup>-/-</sup>* (centro) y *SM-Rcan1<sup>-/-</sup>* (derecha); (d) *EC-Rcan1-1<sup>-/-</sup>* (izquierda), *EC-Rcan1-4<sup>-/-</sup>* (centro) y *EC-Rcan1<sup>-/-</sup>* (derecha), y (e) *Ubc-Rcan1<sup>-/-</sup>*, comparados con animales controles *Rcan1<sup>+/+</sup>*. Los *inmunoblots* son representativos de al menos 3 experimentos.

## La delección inducible de *Rcan1* en endotelio o músculo liso predispone a la formación de lesiones aórticas agudas tras la administración de Ang-II

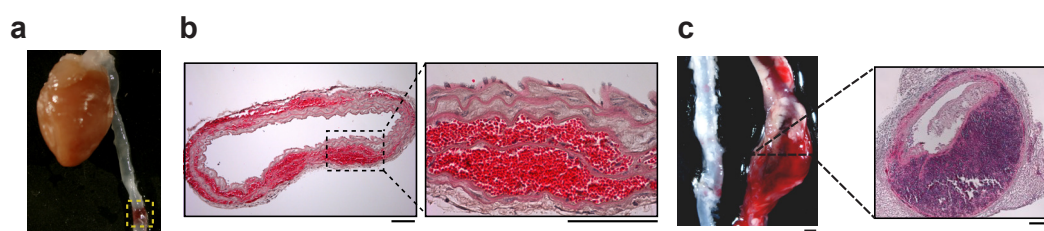
Experimentos anteriores donde se estudió la delección de *Rcan1* mostraron la formación de lesiones hemorrágicas en la aorta tras 1 día de administración de Ang-II (Fig. 21a). El

estudio histológico de estas lesiones reveló la presencia de sangre o hemorragias en la túnica media de la pared vascular, entre las elásticas y las CMLVs (Fig. 21b). Este fenotipo se asimilaba mucho a la patología humana de hematoma intramural (HIM)<sup>53,183</sup>. En algunos casos esporádicos, algunos animales alcanzaron la muerte por DA (Fig. 21c). Para estudiar más en profundidad estos eventos, alargamos los tratamientos con Ang-II hasta 7 días para determinar su evolución.



**Figura 20. La delección inducida de *Rcan1* no produce anomalías cardiovasculares aparentes en animales no tratados con Ang-II. (a)** Peso corporal (g). **(b)** Frecuencia cardíaca (lpm, latidos por minuto). PA **(c)** sistólica y **(d)** diastólica de los ratones de los genotipos indicados. **(e)** Imágenes representativas de la tinción de Hematoxilina y Eosina (HE) de secciones aórticas de los genotipos indicados. Escala, 500  $\mu$ m. (a-e) Los animales estudiados son 40 *Rcan1*<sup>+/+</sup>, 12 *Rcan1*<sup>1-/-</sup>, 11 *Ubc-Rcan1*<sup>1-/-</sup>, 40 *SM-Rcan1*<sup>1-/-</sup>, 6 *SM-Rcan1*<sup>1-/-</sup>, 6 *SM-Rcan1*<sup>4-/-</sup>, 16 *EC-Rcan1*<sup>1-/-</sup>, 6 *EC-Rcan1*<sup>1-/-</sup> y 6 *EC-Rcan1*<sup>4-/-</sup>.

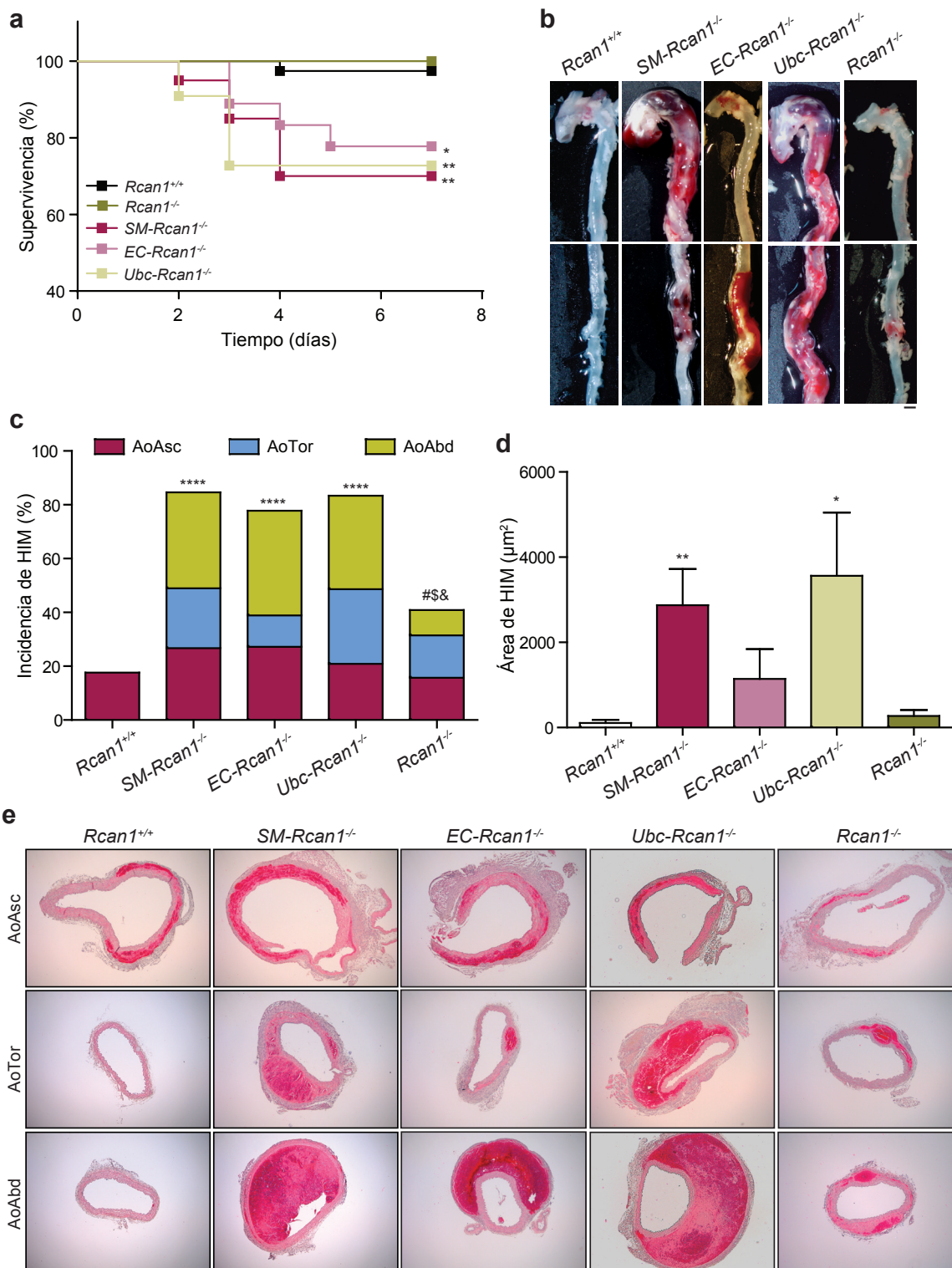
Animales con deficiencia inducida de *Rcan1* en las células de músculo liso (*SM-Rcan1*<sup>-/-</sup>), en las endoteliales (*EC-Rcan1*<sup>-/-</sup>) o de forma ubicua (*Ubc-Rcan1*<sup>-/-</sup>) presentaron eventos de muerte por DA en los primeros 7 días de tratamiento con Ang-II, alcanzando cerca del 30% de mortalidad en el grupo *SM-Rcan1*<sup>-/-</sup>, 35% en *Ubc-Rcan1*<sup>-/-</sup> y 20% en animales *EC-Rcan1*<sup>-/-</sup>. No hubo mortalidad en animales deficientes en *Rcan1* de forma constitutiva (*Rcan1*<sup>-/-</sup>) y hubo 1 caso aislado de 34 (2,9%) en los animales *Rcan1*<sup>+/+</sup> (Fig. 22a). Cerca del 80% de los animales con deficiencia inducida de *Rcan1* que sobrevivieron al tratamiento de 7 días con Ang-II mostraron hemorragias distribuidas a lo largo de la AoAsc, AoTor y AoAbd (Fig. 22b y 22c). La incidencia de los HIM se representa según el porcentaje de animales afectados, y su distribución se muestra en función de la región donde fueron encontrados (Fig. 22c). Animales *Rcan1*<sup>+/+</sup> presentaron lesiones en la AoAsc en un 15% de los casos, coincidiendo con datos descritos anteriormente<sup>184</sup>, pero nunca en AoTor o AoAbd (Fig. 22b-22c). La severidad de los HIM fue cuantificada en función del área ocupada por la hemorragia en secciones aórticas. Los datos indicaban que la delección inducible de *Rcan1* en el músculo liso y de forma ubicua (*SM-Rcan1*<sup>-/-</sup> y *Ubc-Rcan1*<sup>-/-</sup>) generaba lesiones significativamente más severas que los demás genotipos (Fig. 22d-22e), en contraposición con hemorragias leves en animales *Rcan1*<sup>-/-</sup> o en la AoAsc de ratones *Rcan1*<sup>+/+</sup> (Fig. 22e).



**Figura 21. La administración de Ang-II durante 24 horas induce lesiones en la aorta de ratones con delección inducida de *Rcan1* en células de músculo liso.** (a) Imagen macroscópica representativa de la aorta de un animal *SM-Rcan1*<sup>-/-</sup> tras 24h de la infusión de Ang-II (1 µg/kg/min). El recuadro amarillo indica la zona de la lesión. Escala, 1 mm. (b) Imágenes de la tinción con HE de una sección de la región aórtica lesionada indicada en (a). La región marcada con el recuadro punteado se muestra a mayor aumento a la derecha. Escalas, 100 µm. (c) Imágenes de la aorta de un animal fallecido por disección aórtica. Izquierda, imágenes macroscópicas de las aortas de un animal *Rcan1*<sup>+/+</sup> (izquierda) y *SM-Rcan1*<sup>-/-</sup> fallecido (derecha), escala de 1 mm. Derecha, imagen de la tinción con HE de una sección de la región aórtica diseccionada, escala de 200 µm.

Los resultados mostraron que la ausencia de *Rcan1* en músculo liso o en endotelio promueve la aparición de lesiones aórticas agudas tras la administración de Ang-II. Sin embargo, este resultado es opuesto a los estudios que previamente habían demostrado que la ausencia constitutiva de *Rcan1* protegía frente al desarrollo de AAA, entre otros modelos de patología vascular<sup>82,155</sup>. Ante estos resultados paradójicos, comparamos el desarrollo de HIM en los dos modelos ubicuos de ausencia de *Rcan1*, constitutivo e inducible. La delección inducida de *Rcan1* en animales *Ubc-Rcan1*<sup>-/-</sup> presentaba mayor mortalidad, mayor incidencia y mayor severidad que su ausencia constitutiva en animales *Rcan1*<sup>-/-</sup>. Estos datos ponían de manifiesto la importancia de la contribución de *Rcan1* a la estabilidad de la pared vascular.

## Resultados



**Figura 22.** La delección inducida de *Rcan1* predispone a la formación de Hematomas Intramurales y Disecciones Aórticas letales tras la administración de Ang-II. (a) Curva de supervivencia de animales *Rcan1*<sup>+/+</sup> (n=34), *SM-Rcan1*<sup>-/-</sup> (n=20), *EC-Rcan1*<sup>-/-</sup> (n=18), *Ubc-Rcan1*<sup>-/-</sup> (n=11) y *Rcan1*<sup>-/-</sup> (n=17) durante el tratamiento de 7 días con Ang-II. Test Log-rank (Mantel-Cox), \*p<0,05; \*\*p<0,01 vs *Rcan1*<sup>+/+</sup>. (b) Imágenes macroscópicas representativas de las lesiones encontradas en los ratones indicados en (a). Escala, 1 mm. (c) Incidencia de HIM distribuida en aorta ascendente (AoAsc), aorta torácica descendente (AoTor) y aorta abdominal (AoAbd). Distribución Chi-cuadrada, \*\*\*\*p<0,0001 vs *Rcan1*<sup>+/+</sup>, #p<0,05 vs *SM-Rcan1*<sup>-/-</sup>, &p<0,05 vs *EC-Rcan1*<sup>-/-</sup>, \$p<0,05 vs *Ubc-Rcan1*<sup>-/-</sup>. (d) Cuantificación del área de sección aórtica ocupada por el HIM. One-way ANOVA, \*p<0,05; \*\*p<0,01 vs *Rcan1*<sup>+/+</sup>. (e) Imágenes representativas de HIM por tinción HE en secciones aórticas de los animales anteriores. Escala, 500 µm.

Además, indicaban que la delección inducida de *Rcan1* de forma ubicua (*Ubc-Rcan1*<sup>-/-</sup>) generaba respuestas diferentes a su ausencia constitutiva (*Rcan1*<sup>-/-</sup>), sugiriendo la existencia de mecanismos compensatorios durante el desarrollo en el caso constitutivo. También, la similitud de los fenotipos de los ratones deficientes en *Rcan1* en músculo liso o en endotelio sugiere un vínculo y comunicación importantes entre estos dos compartimentos celulares, donde *Rcan1* puede desempeñar un papel transcendental.

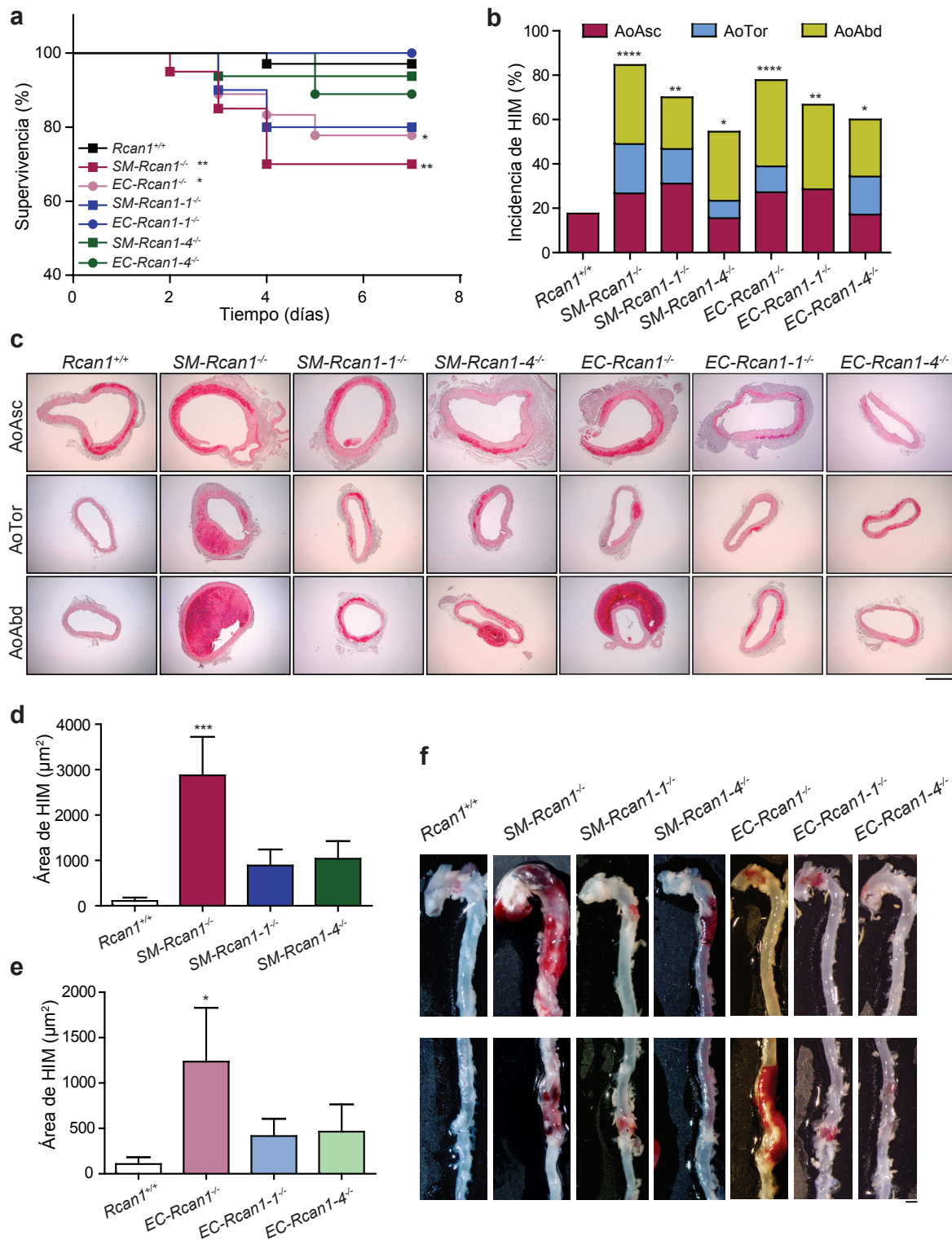
### 1. La ausencia de las distintas isoformas de *Rcan1* en cada uno de los compartimentos presenta un fenotipo más leve de HIM en presencia de Ang-II

Habiendo estudiado los efectos de la ausencia total de *Rcan1* en endotelio y músculo liso, investigamos el papel de cada isoforma en estos mismos compartimentos celulares. Para ello, utilizamos ratones *SM-Rcan1-1*<sup>-/-</sup>, *SM-Rcan1-4*<sup>-/-</sup>, *EC-Rcan1-1*<sup>-/-</sup> y *EC-Rcan1-4*<sup>-/-</sup> y les tratamos con Ang-II, junto con sus controles de delección total *SM-Rcan1*<sup>-/-</sup> y *EC-Rcan1*<sup>-/-</sup>. Los experimentos revelaron que, aunque existieron eventos de muerte por DA en casi todos los grupos de ausencia de *Rcan1*, el aumento de la mortalidad no fue significativo en los casos de ausencia de una sola isoforma, mientras que sí lo fue en los animales *SM-Rcan1*<sup>-/-</sup> y *EC-Rcan1*<sup>-/-</sup> (Fig. 23a). No obstante, aunque no existía un aumento significativo de la mortalidad, sí se detectaron HIM en las aortas de animales *SM-Rcan1-1*<sup>-/-</sup>, *SM-Rcan1-4*<sup>-/-</sup>, *EC-Rcan1-1*<sup>-/-</sup> y *EC-Rcan1-4*<sup>-/-</sup>. Los estudios de incidencia mostraron que las lesiones totales son más frecuentes en ausencia de las dos isoformas juntas (*SM-Rcan1*<sup>-/-</sup> o *EC-Rcan1*<sup>-/-</sup>) que cuando solo se elimina una de ellas (*SM-Rcan1-1*<sup>-/-</sup>, *SM-Rcan1-4*<sup>-/-</sup>, *EC-Rcan1-1*<sup>-/-</sup> y *EC-Rcan1-4*<sup>-/-</sup>) (Fig. 23b). El tamaño y la severidad de los HIMs se apreciaban por análisis histológico de secciones aórticas de estos animales (Fig. 23c). En términos de severidad o área ocupada por la hemorragia, la deficiencia total de *Rcan1* también mostraba valores mayores que la ausencia de las isoformas por separado, tanto en músculo liso (Fig. 23d) como en endotelio (Fig. 23e). La severidad y tamaño de los HIMs se apreciaban también a nivel macroscópico en las aortas de estos ratones (Fig. 23f).

Estos datos sugerían que, en un contexto vascular hipertensivo, no existía una función diferencial para las isoformas *Rcan1-1* y *Rcan1-4*. Por el contrario, su delección conducía a fenotipos similares, e incluso aditivos cuando los comparábamos con la ausencia de los dos miembros al mismo tiempo. Por ello, en los experimentos posteriores de caracterización del fenotipo de HIM nos centramos principalmente en el estudio de la ausencia total de *Rcan1* en los distintos compartimentos celulares.

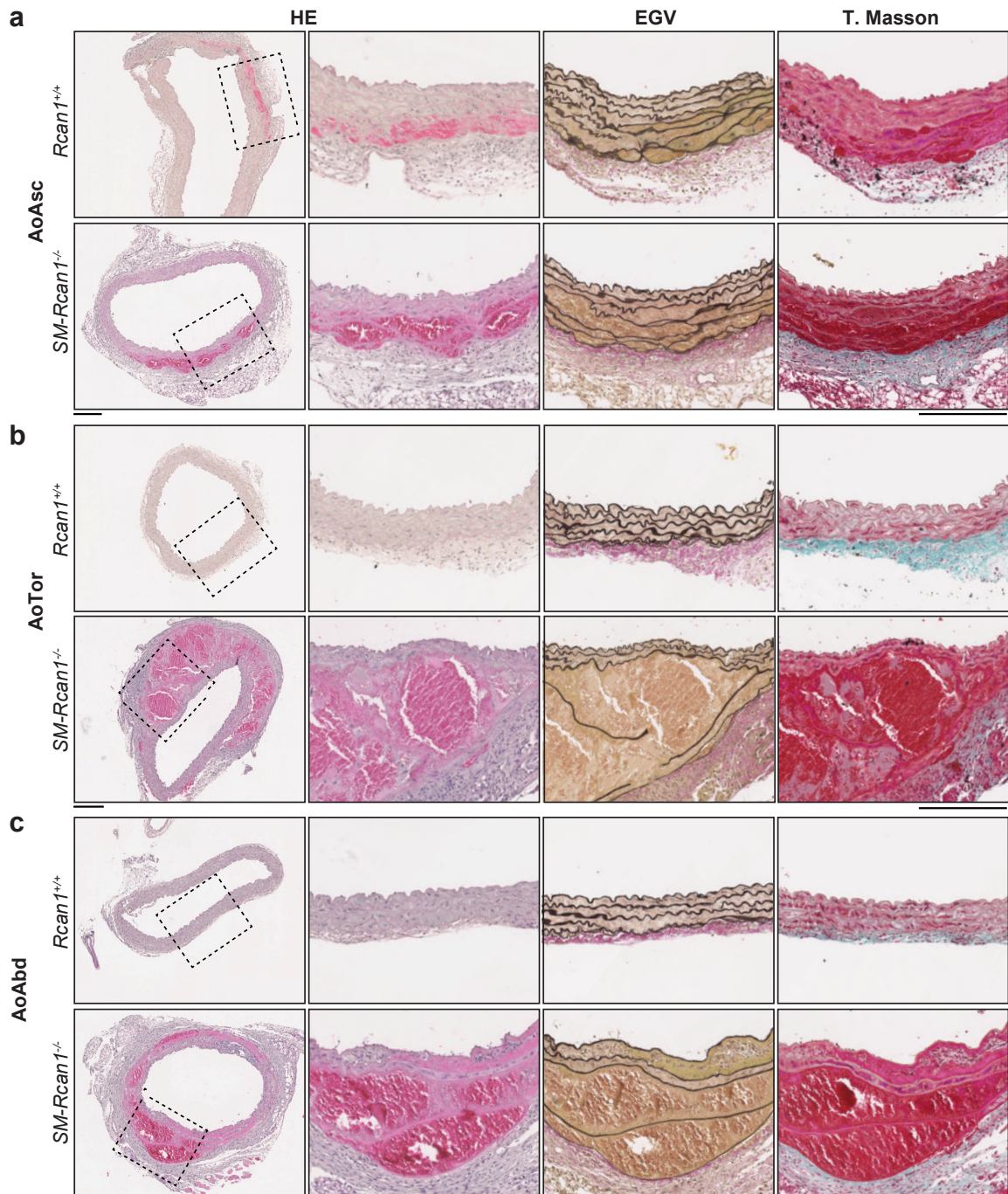
Para un análisis histológico más detallado de las lesiones por HIM, se tiñeron secciones aórticas con hematoxilina-eosina (HE), tinción de elásticas de Van Gieson (EVG) y Tricrómico de Masson (T. Masson) (Fig. 24). Las imágenes obtenidas mostraron que las lesiones eran más severas en la regiones de AoTor (Fig. 24b) y AoAbd (Fig. 24c), caracterizándose por una

## Resultados



**Figura 23.** La delección inducida de una isoforma de *Rcan1* predispone a la formación de HIMs con menor severidad que la delección simultánea de las dos isoformas. **(a)** Curva de supervivencia de los animales indicados durante el tratamiento de 7 días con Ang-II. Test Log-rank (Mantel-Cox), \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  vs *Rcan1*<sup>+/+</sup>. **(b)** Porcentaje de incidencia de HIM en los animales indicados. Distribución Chi-cuadrada, \*\*\*\* $p < 0,0001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$  vs *Rcan1*<sup>+/+</sup>. **(c)** Imágenes representativas de HIM por tinción HE en secciones aórticas de los animales anteriores. Escala, 500 µm. **(d-e)** Cuantificación del área del hematoma en las secciones histológicas de los animales indicados. One-way ANOVA, \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$  vs *Rcan1*<sup>+/+</sup>. **(f)** Imágenes macroscópicas representativas de las lesiones en los animales de los genotipos indicados. Escala, 1 mm. (a-f) *Rcan1*<sup>+/+</sup> (n=34), *SM-Rcan1*<sup>-/-</sup> (n=20), *SM-Rcan1-1*<sup>-/-</sup> (n=10), *SM-Rcan1-4*<sup>-/-</sup> (n=16), *EC-Rcan1*<sup>-/-</sup> (n=18), *EC-Rcan1-1*<sup>-/-</sup> (n=7) y *EC-Rcan1-4*<sup>-/-</sup> (n=9).

acumulación de eritrocitos en la túnica media, entre las láminas elásticas. No se observaba aumento de fibrosis (T. Masson), previsiblemente debido a los tiempos tempranos de la patología. Se observaba una desorganización de las láminas elásticas (EVG), que es más evidente en las lesiones de mayor severidad encontradas en regiones AoTor y AoAbd. En muchos casos no sólo existía desorganización sino también rotura de las capas elásticas (Fig. 24b-24c).



**Figura 24. Caracterización histológica de los HIMs.** Las imágenes muestran secciones de la aorta (a) ascendente, (b) torácica y (c) abdominal de ratones *Rcan1*<sup>+/+</sup> y *SM-Rcan1*<sup>-/-</sup> teñidas con HE, tinción de elásticas de Van Gieson (EVG) y tinción Tricrómica de Masson (T. Masson). Escalas, 200  $\mu$ m.

### 2. La hipertensión arterial es el inductor de las lesiones aórticas agudas

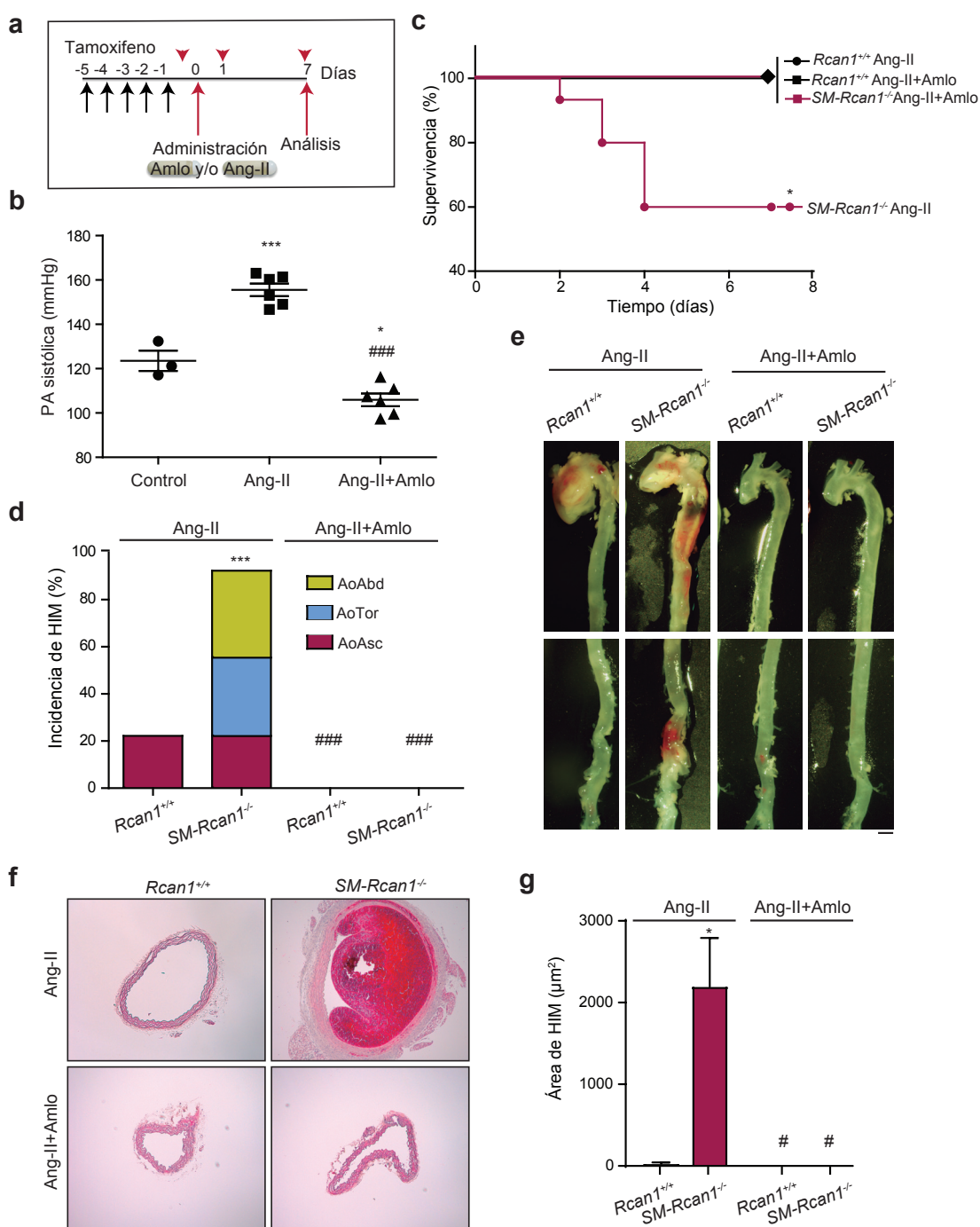
La experiencia previa con pacientes humanos ha indicado que la presencia de HIMs está asociada a la edad avanzada y a la hipertensión<sup>60,62</sup>. Ang-II tiene un campo de acción amplio e interviene en diversos procesos, incluyendo la inducción de hipertensión, pero también la formación de fibrosis y activación de la inflamación, entre otros. Por ello decidimos comprobar si el fenotipo que encontramos en nuestros animales tras la administración de Ang-II se debía únicamente al aumento de la PA, o si por el contrario Ang-II está participando en otros procesos. Para ello llevamos a cabo experimentos complementarios, donde estudiamos el efecto que la prevención de la hipertensión inducida por Ang-II o el aumento de PA por medios independientes a Ang-II, tenían sobre el desarrollo de HIMs.

#### 2.1. El tratamiento anti-hipertensivo con amlodipino previene la formación de DAs y de HIMs inducida por Ang-II

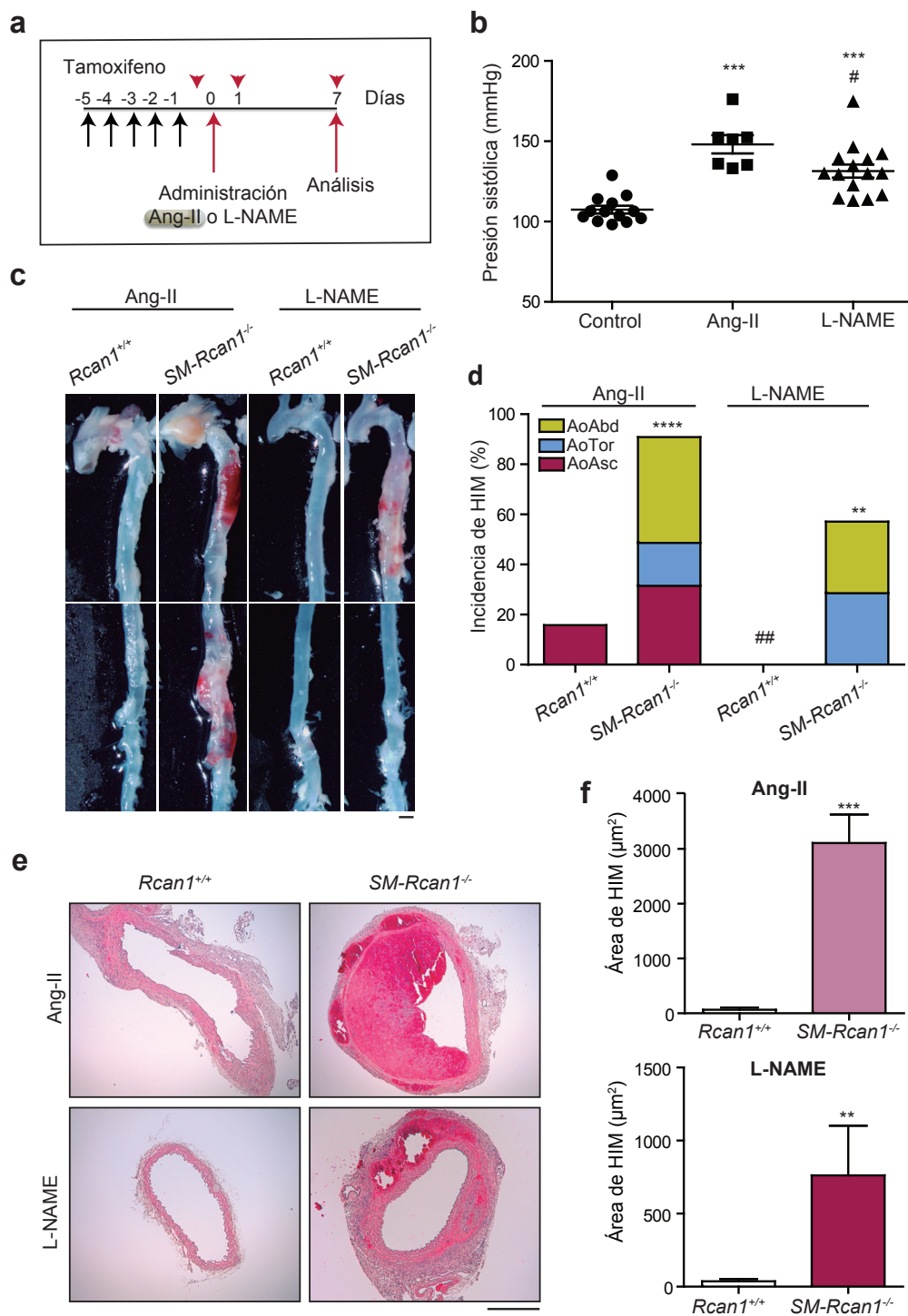
Tratamos ratones *Rcan1*<sup>+/+</sup> y *SM-Rcan1*<sup>-/-</sup> con Ang-II únicamente, o simultáneamente con el hipotensor amlodipino (Amló)<sup>185</sup> mediante mini-bombas de infusión osmótica. El tratamiento se mantuvo durante 7 días monitorizando la PA a diferentes tiempos (Fig. 25a). El tratamiento con Amló fue suficiente para prevenir el aumento de la PA inducido por la Ang-II (Fig. 25b), previniendo la formación de HIMs y evitando la muerte por DA, que se observó únicamente en animales *SM-Rcan1*<sup>-/-</sup> tratados con Ang-II (Fig. 25c). La prevención de los HIM se observó en todas las regiones: AoAsc, AoTor y AoAbd (Fig. 25d-25e). El análisis histológico de las secciones aórticas de estos animales se utilizó para cuantificar el área ocupada por el HIM, mostrando igualmente el gran efecto protector del hipotensor Amló en este modelo (Fig. 25f-25g).

#### 2.2. El incremento de la PA con fármacos diferentes a la Ang-II genera HIMs en los animales con delección de *Rcan1*

De forma similar al experimento de prevención de la hipertensión, usamos animales con delección de *Rcan1* en el músculo liso para inducir aumento en la PA mediante un tratamiento farmacológico alternativo a la Ang-II. Para ello, se administró Ang-II o L-NAME a animales *Rcan1*<sup>+/+</sup> y *SM-Rcan1*<sup>-/-</sup>. El tratamiento se hizo durante 7 días monitorizando la PA a diferentes tiempos (Fig. 26a). El L-NAME es un inhibidor de la síntesis de NO que tiene como efecto la inhibición de la relajación arterial y un aumento de la PA<sup>186</sup>. El aumento de la PA inducido por L-NAME es significativo, alcanzando niveles de PA sistólica cercanos a 140 mmHg, aunque no llegan a los niveles alcanzados por el tratamiento con Ang-II (Fig. 26b). El aumento de la PA inducido por L-NAME también generó la aparición de lesiones aórticas similares a los HIMs producidos por Ang-II (Fig. 26c). La incidencia de estas lesiones, cercana al 60% de los casos, era exclusiva de las regiones aórticas descendentes, AoTor y AoAbd (Fig. 26c-26d).



**Figura 25. La prevención de la hipertensión inducida por Ang-II evita la formación de HIM y DA letales.** (a) Esquema temporal del abordaje experimental. Flechas negras, administración de tamoxifeno. Puntas de flecha roja, mediciones de la PA. Flechas rojas, principio y fin de la administración de amlodipino (6mg/kg/día) y/o Ang-II (1µg/kg/min) mediante mini-bombas osmóticas. (b) Medidas de PA sistólica tras 7 días de tratamiento. Control (tratado con salino, n=3); Ang-II (tratado con Ang-II, n=6) y Ang-II+Amlodipino (tratamiento conjunto de Ang-II y Amlodipino, n=6). One-way ANOVA, \*p<0,05; \*\*\*p<0,001 vs Control; ###p<0,001 vs Ang-II. (c) Curva de supervivencia de animales co-tratados con amlodipino (Amlodipino) o suero salino (Salino) junto con Ang-II. Test Log-rank (Mantel-Cox), \*p<0,05 vs *Rcan1*<sup>+/+</sup>Salino. El rombo indica el 100% de supervivencia para tratamientos con Amlodipino en animales *Rcan1*<sup>+/+</sup> y *SM-Rcan1*<sup>-/-</sup> y tratamiento Salino en *Rcan1*<sup>+/+</sup>. (d) Incidencia de HIM de los animales indicados tratados con Amlodipino y/o Ang-II. Distribución Chi-cuadrada, \*\*\*p<0,001 vs *Rcan1*<sup>+/+</sup>Salino; ###p<0,001 vs *SM-Rcan1*<sup>-/-</sup> Salino. (e) Imágenes macroscópicas representativas de las aortas de los genotipos y tratamientos indicados. Escala, 1 mm. (f) Imágenes de secciones aórticas con tinción HE representativas. Escala, 500 µm. (g) Cuantificación del área de sección aórtica ocupada por el HIM. One-way ANOVA, \*p<0,05 vs *Rcan1*<sup>+/+</sup>Salino; #p<0,05 vs *SM-Rcan1*<sup>-/-</sup> Salino. Animales *Rcan1*<sup>+/+</sup>Salino (n=8), *Rcan1*<sup>+/+</sup> Amlodipino (n=6), *SM-Rcan1*<sup>-/-</sup>Salino (n=15) y *SM-Rcan1*<sup>-/-</sup> Amlodipino (n=6).



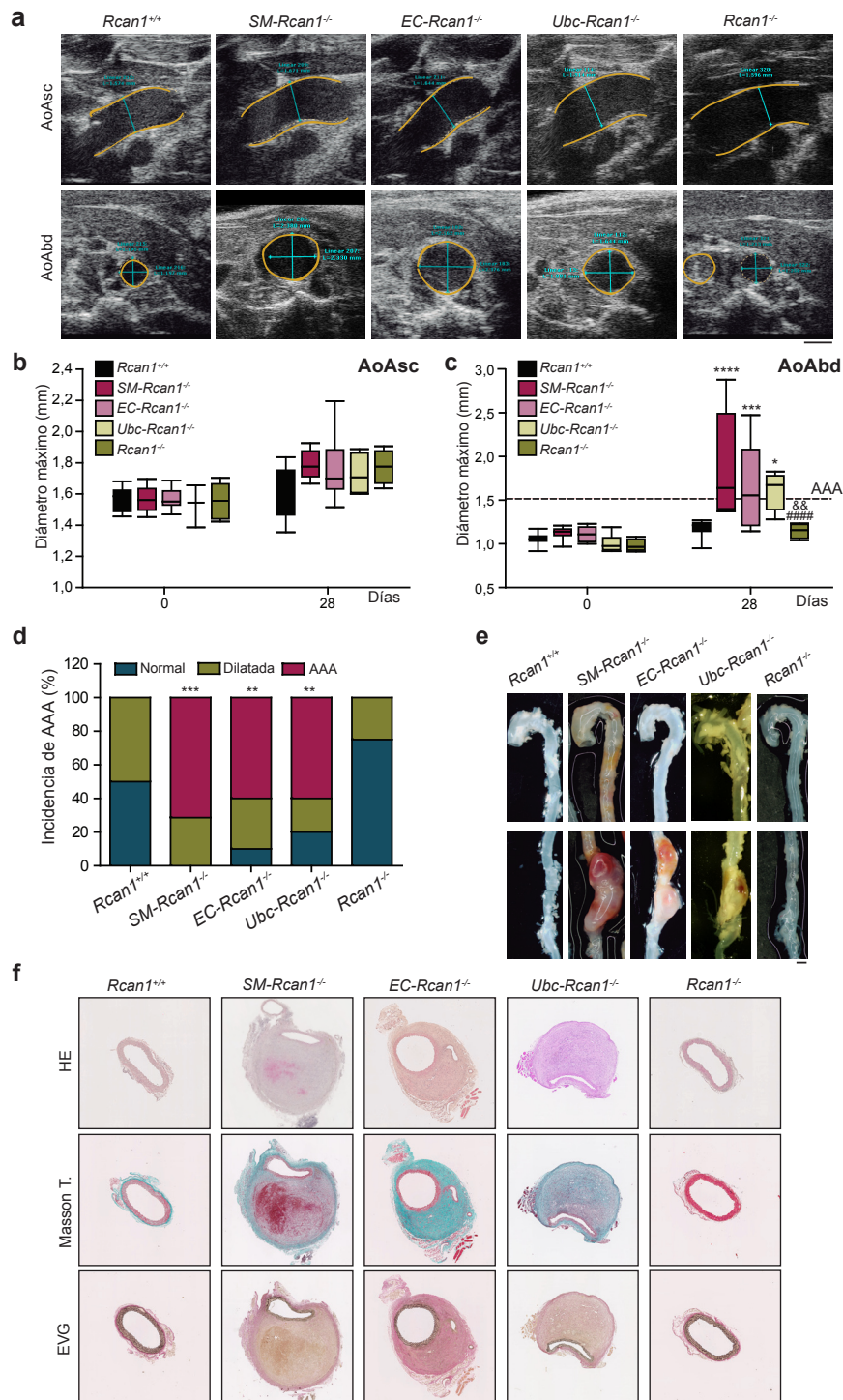
**Figura 26. El incremento de la PA genera HIM en los animales deficientes en *Rcan1* independientemente de Ang-II.** (a) Esquema temporal del abordaje experimental. Flechas negras, administración de tamoxifeno. Puntas de flecha roja, mediciones de la PA. Flechas rojas, principio y fin de administración de Ang-II (1µg/kg/min) o L-NAME (0,5 g/L en agua de bebida). (b) Medidas de PA sistólica tras 7 días de tratamiento. Control (tratado con salino, n=12); Ang-II (n=7) y L-NAME (n=15). *One-way ANOVA*, \*\*\**p*<0,001 vs Control; #*p*<0,05 vs Ang-II. (c) Imágenes representativas de lesiones en las aortas de los ratones de los genotipos indicados tratadas con L-NAME o Ang-II. Escala, 1 mm. (d) Incidencia de HIM en los ratones de los genotipos y tratamientos indicados. Distribución Chi-cuadrada, \*\*\*\**p*<0,0001; \*\**p*<0,01 vs *Rcan1*<sup>+/+</sup> Ang-II; ##*p*<0,01 vs *Rcan1*<sup>+/+</sup>L-NAME (e) Imágenes representativas de secciones aórticas abdominales teñidas con HE. Escala, 500 µm. (f) Área ocupada por el HIM cuantificada en las secciones aórticas de los animales de los genotipos indicados tratados con Ang-II (gráfica superior) o con L-NAME (gráfica inferior). *T-test*, \*\**p*<0,01; \*\*\**p*<0,001 vs *Rcan1*<sup>+/+</sup>. *Rcan1*<sup>+/+</sup> Ang-II (n=8), *Rcan1*<sup>+/+</sup>L-NAME (n=7), *SM-Rcan1*<sup>-/-</sup> Ang-II (n=15) y *SM-Rcan1*<sup>-/-</sup>L-NAME (n=8).

Las secciones aórticas de estas lesiones mostraban un fenotipo muy parecido al visto anteriormente con Ang-II (Fig. 26e). La cuantificación del área ocupada por la hemorragia mostraba que, aunque la severidad era mayor tras el tratamiento con Ang-II, la administración de L-NAME indujo en animales *SM-Rcan1<sup>-/-</sup>* lesiones significativamente más grandes que en ratones *Rcan1<sup>+/+</sup>* (Fig. 26f).

Estos datos sugerían que, lejos de ser un efecto estrictamente ligado a la estimulación con Ang-II, la formación de los HIMs parecía ser dependiente del aumento de la PA *per se*. Considerando esta hipótesis, cabría esperar que la pared arterial de ratones *SM-Rcan1<sup>-/-</sup>* (y posiblemente también de *Ubc-Rcan1<sup>-/-</sup>* y *EC-Rcan1<sup>-/-</sup>*) se encontrara inicialmente comprometida por la ausencia de *Rcan1*, y fuera el estrés hipertensivo quien desencadenase la aparición de los signos clínicos como acumulación de sangre, el HIM, DA y muerte encontrados posteriormente.

### 3. Los HIMs evolucionan a AAA en animales deficientes en *Rcan1* tratados con Ang-II durante 28 días

En los apartados 1 y 2 hemos visto que la infusión con Ang-II puede causar lesiones agudas en la aorta, que en animales silvestres afecta únicamente a la AoAsc de aproximadamente un 15% de la población, como también había sido descrito anteriormente<sup>184</sup>. *Rateri et al.* mostró que los HIMs observados a tiempos tempranos de tratamiento con Ang-II (5-7 días) no se mantenían en el tiempo, si no que se veían resueltos a tiempos más largos de tratamiento (28 días)<sup>184</sup>. Por otro lado, datos en pacientes humanos indicaban que los HIMs podrían desembocar en el tiempo en la formación de aneurismas<sup>187</sup>. Para caracterizar mejor la patología aórtica observada en ausencia de *Rcan1*, decidimos estudiar la evolución de los HIMs tras 28 días de administración de Ang-II. La AoAsc y AoAbd de animales *SM-Rcan1<sup>-/-</sup>*, *EC-Rcan1<sup>-/-</sup>*, *Ubc-Rcan1<sup>-/-</sup>*, *Rcan1<sup>-/-</sup>* y *Rcan1<sup>+/+</sup>* fueron monitorizadas por ultrasonidos a lo largo del tratamiento. Las medidas aórticas tomadas a tiempo inicial y final no revelaban diferencias en el diámetro de la AoAsc de los distintos genotipos (Fig. 27a-27b). En cuanto a la AoAbd, el diámetro a tiempo final de tratamiento era significativamente mayor en animales *SM-Rcan1<sup>-/-</sup>*, *EC-Rcan1<sup>-/-</sup>* y *Ubc-Rcan1<sup>-/-</sup>*, quienes alcanzaron diámetros aórticos abdominales superiores a 1,5mm (Fig. 27a y 27c). En contra, no se observó dilatación en la AoAbd de animales *Rcan1<sup>-/-</sup>* o *Rcan1<sup>+/+</sup>*. Los diámetros encontrados suponen en algunos casos un aumento de más de 1,5 veces el diámetro inicial en condiciones basales, y por lo tanto son considerados AAA<sup>188,189</sup>. Para mejor comprensión de los datos, realizamos una clasificación atendiendo al diámetro (d) de AoAbd, donde consideramos como normales las aortas con  $d < 1,2\text{mm}$ ; aquellas comprendidas entre  $1,2\text{mm} < d < 1,5\text{mm}$  las consideramos con dilatación moderada, pero no AAA; y las de  $d > 1,5\text{mm}$  como AAA (Fig. 27d). Según estos criterios, la incidencia total de AAA es del 65% para la delección en músculo liso y del 60% para la delección en el endotelio o de forma ubicua.

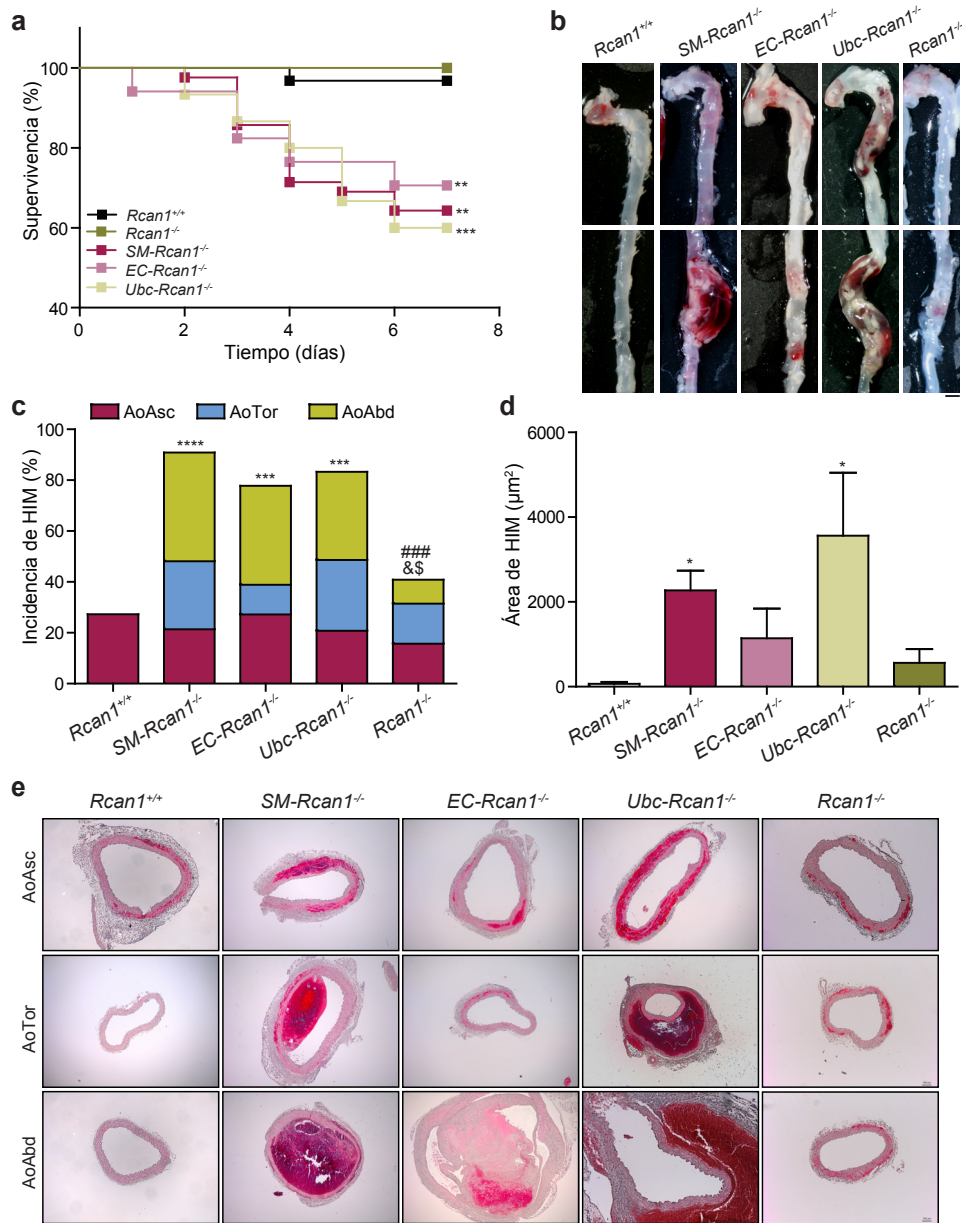


**Figura 27. Los HIMs formados en ratones con deficiencia inducida de Rcan1 evolucionan hasta formar AAA.** (a) Imágenes representativas de la AoAsc (paneles superiores) y de la AoAbd (paneles inferiores) visualizadas mediante ecografía por ultrasonidos en ratones de los genotipos indicados. Las líneas amarillas delimitan el borde de la aorta y las líneas azules el diámetro. (b-c) Cuantificación del diámetro máximo de la (b) la AoAsc y (c) la AoAbd determinado mediante esta técnica al inicio y al final del experimento (28 días). Diámetros mayores de 1,5 mm fueron considerados AAA. *Two-way ANOVA*, \*\*\*\* $p < 0,0001$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \* $p < 0,05$  vs *Rcan1*<sup>+/+</sup>; #### $p < 0,0001$  vs *SM-Rcan1*<sup>-/-</sup>; && $p < 0,01$  vs *EC-Rcan1*<sup>-/-</sup>. (d) Incidencia de dilatación aórtica y formación de AAA en los ratones de los genotipos indicados. Las aortas se clasificaron según su diámetro: Normal:  $d < 1,2\text{mm}$ ; Dilatada:  $1,2\text{mm} < d < 1,5\text{mm}$ ; AAA:  $d > 1,5\text{mm}$ . Distribución Chi-cuadrada, \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$  vs *Rcan1*<sup>+/+</sup>. (e) Imágenes representativas de aortas con AAA en ratones de los genotipos indicados tras 28 días de infusión con Ang-II. Escala, 1 mm. (f) Imágenes representativas de secciones aórticas teñidas con HE (superior), T. Masson (centro) y EVG (inferior). Escala, 500  $\mu\text{m}$ . *Rcan1*<sup>+/+</sup> (n=12), *SM-Rcan1*<sup>-/-</sup> (n=12), *EC-Rcan1*<sup>-/-</sup> (n=12), *Ubc-Rcan1*<sup>-/-</sup> (n=6) y *Rcan1*<sup>-/-</sup> (n=6).

Imágenes representativas de las lesiones encontradas en estos animales mostraban AAA de tipo sacular y en algunos casos fusiformes, siempre en la AoAbd en la zona superior a las bifurcaciones renales (Fig. 27e). Las lesiones presentadas en la AoAsc tras la administración de Ang-II durante 7 días, parecían desaparecer a tiempos posteriores de tratamiento en todos los genotipos, ya que no se observa ninguna lesión ascendente tras 28 días de Ang-II (Fig. 27e). Las imágenes histológicas de secciones aórticas mostraban el aumento de diámetro aórtico externo (Fig. 27f). La formación de AAA iba acompañada no sólo de un aumento del diámetro, sino también de fibrosis, como se observaba mediante tinción de Masson. La tinción de elásticas EVG mostraba también la desorganización de láminas elásticas (Fig. 27f). Los ratones *Rcan1*<sup>-/-</sup> presentaron un comportamiento similar al de los *Rcan1*<sup>+/+</sup>, con ausencia de dilatación o AAA y aspecto normal en imágenes macroscópicas e histológicas (Fig. 27a-27f), corroborando los datos publicados anteriormente<sup>82,155</sup>.

A pesar de nuestros intentos mediante diversos métodos de imagen para identificar los HIMs *in vivo*, no hemos podido detectar las hemorragias en el ratón vivo, lo cual nos ha obligado a sacrificarlos para su estudio a tiempo final. Esta dificultad nos ha impedido hacer estudios longitudinales de evolución de la patología. En su lugar, todos los experimentos realizados con infusión de Ang-II durante 28 días se realizaron siempre en paralelo con su grupo control tratado durante 7 días con la misma dosis. Mediante estos experimentos hemos comprobado que los ratones tratados durante 7 días seguían mostrando la presencia de disecciones letales en la aorta (Fig. 28a), hemorragias distribuidas a lo largo de la aorta con incidencias cercanas al 90% (Fig. 28b-28c) y acumulación de sangre en la capa media de la arteria (Fig. 28d-28e). Aunque los sujetos estudiados tras 7 y 28 días de tratamiento con Ang-II no eran estrictamente los mismos, estos datos sugieren que los HIMs manifestados en los primeros 7 días del estímulo hipertensivo son la respuesta aguda y en muchos casos letal y que con el tiempo puede evolucionar de forma variable hacia su resolución, como ocurre en la AoAsc de los ratones *Rcan1*<sup>+/+</sup>; o hacia su cronificación y conversión en aneurisma, como ocurre en la AoAbd de los ratones con delección inducida de *Rcan1*. Esta complejidad en la evolución del fenotipo se asemeja mucho al comportamiento de los HIMs conocidos en pacientes humanos, convirtiendo este modelo en un modelo fiel de estudio de los HIMs en ratón.

## Resultados

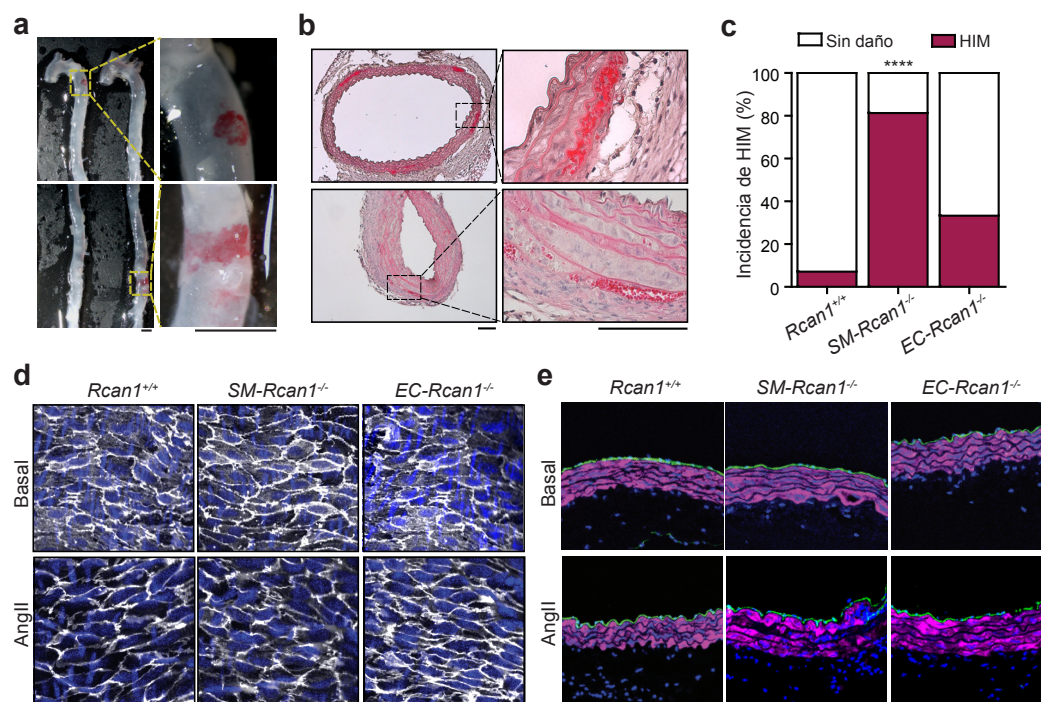


**Figura 28.** El tratamiento de 7 días con Ang-II confirma la formación de HIM en paralelo a la evolución hacia AAA tras 28 días. **(a)** Curva de supervivencia y **(b)** imágenes macroscópicas representativas de las lesiones encontradas en animales de los genotipos indicados durante el tratamiento de 7 días con Ang-II. Test Log-rank (Mantel-Cox), \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  vs *Rcan1*<sup>+/+</sup>. Escala, 1 mm. **(c)** Incidencia de HIM en estos animales. Distribución Chi-cuadrada, \*\*\*\* $p < 0,0001$ ; \*\*\* $p < 0,001$  vs *Rcan1*<sup>+/+</sup>, ### $p < 0,001$  vs *SM-Rcan1*<sup>-/-</sup>, & $p < 0,05$  vs *EC-Rcan1*<sup>-/-</sup>, \$ $p < 0,05$  vs *Ubc-Rcan1*<sup>-/-</sup>. **(d)** Cuantificación del área de sección aórtica ocupada por la sangre en el mismo grupo de animales. One-way ANOVA, \* $p < 0,05$  vs *Rcan1*<sup>+/+</sup>. **(e)** Imágenes representativas de tinción HE en secciones aórticas de los animales anteriores. Escala, 500 μm. *Rcan1*<sup>+/+</sup> (n=31), *SM-Rcan1*<sup>-/-</sup> (n=32), *EC-Rcan1*<sup>-/-</sup> (n=17), *Ubc-Rcan1*<sup>-/-</sup> (n=12) y *Rcan1*<sup>-/-</sup> (n=17).

#### 4. Los pasos iniciales en la formación del HIM sugieren la implicación de vasos perivasculares y la alteración de la homeostasis de la pared arterial

##### 4.1. Tratamientos cortos con Ang-II (6h) generan HIMs incipientes con hemorragias en las capas más externas de la túnica media

Habiendo determinado la importancia de la subida repentina de PA en el desarrollo del HIM, nos planteamos estudiar los pasos previos e iniciales de su aparición. Para ello, administramos Ang-II a ratones *Rcan1<sup>+/+</sup>*, *SM-Rcan1<sup>-/-</sup>* y *EC-Rcan1<sup>-/-</sup>* durante tiempos cortos (6 horas). Este tratamiento fue suficiente para inducir la formación de HIM incipientes en la aorta de estos animales (Fig. 29a). Sorprendentemente, el análisis histológico mostró una acumulación de la sangre prioritariamente en las capas más externas de la túnica media, es decir, cercanas a la adventicia (Fig. 29b), no encontrándose hemorragias incipientes en capas próximas al endotelio aórtico. Estas lesiones incipientes afectaron al 80% de los animales *SM-Rcan1<sup>-/-</sup>* y al 40% de los *EC-Rcan1<sup>-/-</sup>* (Fig. 29c).



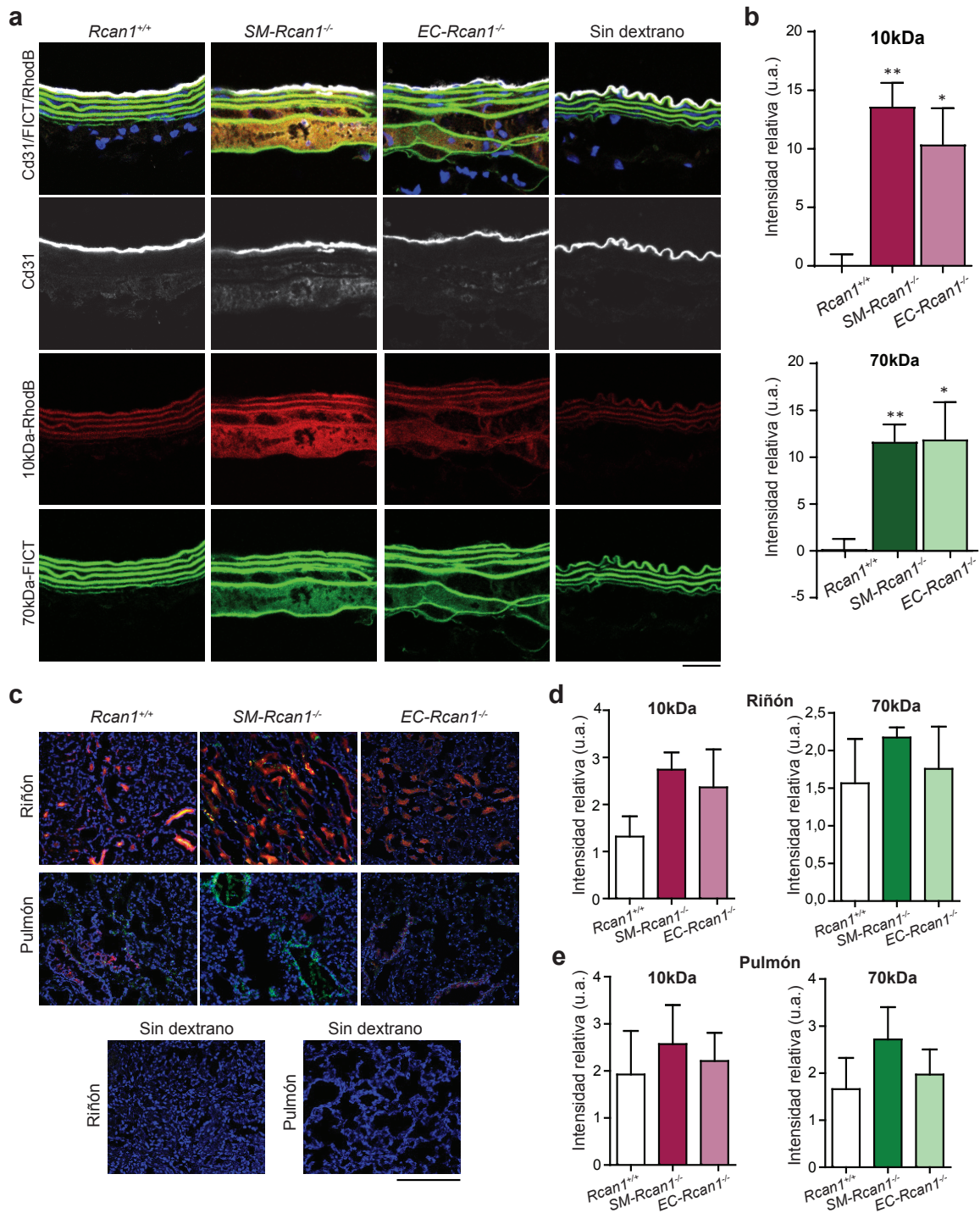
**Figura 29.** El HIM se inicia en las capas externas de la lámina media y sin daño aparente en la lámina íntima. **(a)** Imágenes macroscópicas representativas de aortas con hematomas incipientes tras 6 horas de tratamiento con Ang-II. El recuadro amarillo discontinuo indica la zona ampliada a la derecha. Escalas, 1 mm. **(b)** Secciones aórticas teñidas con HE representativas de los hematomas incipientes. El recuadro discontinuo señala la zona ampliada a la derecha. Escalas, 100  $\mu$ m. **(c)** Incidencia de HIM tras 6 horas de tratamiento con Ang-II (1  $\mu$ g/kg/min). Chi-cuadrada, \*\*\*\* $p < 0,0001$  vs *Rcan1<sup>+/+</sup>*. *SM-Rcan1<sup>-/-</sup>* (n=16) y *EC-Rcan1<sup>-/-</sup>* (n=12) comparados con *Rcan1<sup>+/+</sup>* (n=14). **(d)** Inmunofluorescencia representativa de Cd31 (gris) y fluorescencia de núcleos teñidos con DAPI (azul) en aortas en face en condiciones basales (superior) o tras 6 horas de tratamiento con Ang-II (1  $\mu$ g/kg/min) (inferior). Escala, 20  $\mu$ m. **(e)** Inmunofluorescencia representativa de Cd31 (verde), SMA (rosa) y fluorescencia de núcleos teñidos con DAPI (azul) en secciones aórticas transversales en condiciones basales (superior) o tras 6 horas de tratamiento con Ang-II (inferior). Escala, 50  $\mu$ m.

Las imágenes histológicas sugerían que la sangre no procedía del lumen principal de la aorta, y mostraban que la capa endotelial no estaba dañada. Las tinciones con Cd31 mostraron la integridad de la capa endotelial en las aortas de estos animales en condiciones basales y tras la administración de Ang-II durante 6 horas (Fig. 29d-29e). Estas tinciones se realizaron para estudiar el endotelio tanto en un plano longitudinal, mediante aortas *en face* (Fig. 29d), como mediante planos transversales en cortes histológicos (Fig. 29e). Estos datos nos indicaron por un lado que la integridad del endotelio no se encontraba comprometida en los ratones estudiados, y por otro sugerían que la hemorragia en los HIM incipientes pudiera proceder de vasos perivasculares cercanos a la adventicia o del *vasa vasorum*, aunque su existencia es controvertida. Estos datos apuntaban a un origen perivascular de la hemorragia.

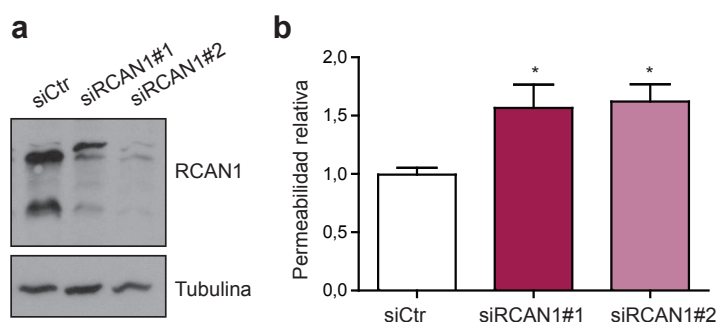
### 4.2. La delección inducible de *Rcan1* aumenta la permeabilidad vascular en aorta

Para comprobar el origen de la sangre en los HIMs, se llevaron a cabo experimentos de permeabilidad *in vivo*. Tratamos ratones *SM-Rcan1<sup>-/-</sup>*, *EC-Rcan1<sup>-/-</sup>* y *Rcan1<sup>+/+</sup>* con Ang-II durante 6 horas y posteriormente les inyectamos por vía intravenosa una solución con dextranos de 10 kDa y 70 kDa conjugados con los fluoróforos RhodB y FICT, respectivamente. Analizamos los tejidos de estos ratones mediante microscopía confocal para detectar las moléculas fluorescentes. Las secciones transversales de aorta de los ratones *SM-Rcan1<sup>-/-</sup>* y *EC-Rcan1<sup>-/-</sup>* mostraron una clara acumulación de dextranos, lo que podría sugerir un aumento de la permeabilidad vascular. En concordancia con la localización de las hemorragias, la acumulación de los dextranos se localizó preferentemente en las regiones de las capas de la túnica media más externas o cercanas a la adventicia. En estas mismas secciones donde detectamos la permeabilización de los dextranos, se comprobamos en paralelo la integridad del endotelio mediante inmunofluorescencia de Cd31 (Fig. 30a). La cuantificación de la señal fluorescente procedente de los dextranos de ambos tamaños mostró un aumento significativo de la permeabilidad en animales *SM-Rcan1<sup>-/-</sup>* y *EC-Rcan1<sup>-/-</sup>* (Fig. 30b).

De forma similar, se estudió la permeabilidad en otros tejidos altamente vascularizados, como son los pulmones y los riñones. Aunque se detectó la presencia de dextranos en ambos tejidos (Fig. 30c), la cuantificación reveló una tendencia al aumento de la permeabilidad en ausencia de *Rcan1* que no llegó a alcanzar niveles estadísticamente significativos ni en riñones (Fig. 30d) ni en pulmones (Fig. 30e). Por otro lado, comprobamos el aumento en la permeabilidad vascular *in vitro* en experimentos con células HUVECs (Fig. 31). HUVECs fueron transfectadas con ARNi con dos secuencias diana diferentes para silenciar *RCAN1* (Fig. 31a). La ausencia de *RCAN1* en estas células comprometió la integridad de la monocapa aumentando el paso de dextranos marcados a través de ella, indicativo de un aumento en la permeabilidad vascular (Fig. 31b).



**Figura 30.** La permeabilidad vascular está aumentada en las capas externas de la lámina media en ratones con delección inducida de *Rcan1*. **(a)** Imágenes representativas de la acumulación de dextrano conjugado 70kDa-FICT (verde) y 10kDa-RhodB (rojo) en ratones *Rcan1*<sup>+/+</sup> (n=10), *SM-Rcan1*<sup>-/-</sup> (n=16) y *EC-Rcan1*<sup>-/-</sup> (n=12) tratados 6 horas con Ang-II. Las aortas fueron teñidas con un anticuerpo anti-Cδ31 (gris) y los núcleos con DAPI (azul). Escala, 50 μm. **(b)** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia por acumulación de dextranos (panel superior) 70kDa-FICT y (panel inferior) 10kDa-RhodB en secciones aórticas de los mismos ratones. Unidades arbitrarias (u.a.). One-way ANOVA, \*p<0,05; \*\*p<0,01 vs *Rcan1*<sup>+/+</sup>. **(c)** Imágenes representativas de acumulación de dextranos conjugados 70kDa-FICT (verde) y 10kDa-RhodB (rojo) en (panel superior) riñones y (panel inferior) pulmones de los mismos ratones. Los núcleos teñidos con DAPI (azul). Escala, 50 μm. **(d-e)** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia por acumulación de dextranos en **(d)** riñones y **(e)** pulmones de estos mismos ratones.



**Figura 31. El silenciamiento de *Rcan1* in vitro aumenta la permeabilidad endotelial.** (a) Inmunoblot representativo (n=4) de RCAN1 de células HUVEC transfectadas con ARN pequeños de interferencia específicos para RCAN1 (siRCAN1#1 y siRCAN1#2) comparados con secuencia inespecífica control (siCtrl). Tubulina, control de carga. (b) Permeabilidad endotelial cuantificada como la fluorescencia (dextrano 70kDa-FITC) que atraviesa la monocapa endotelial a los 30 minutos normalizada con siCtrl. *One-way* ANOVA, \* $p < 0,05$  vs siCtrl. Los datos son la media de 12 replicados de cada condición en 3 experimentos independientes.

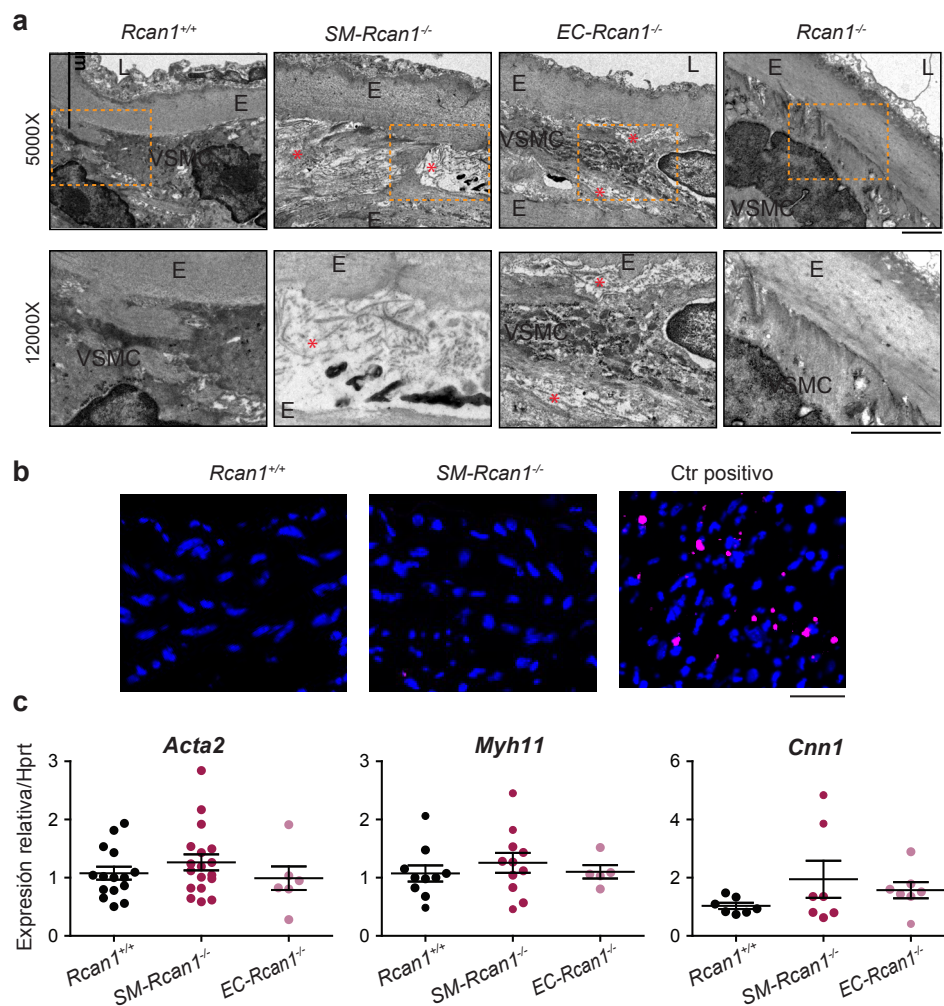
Los resultados de aumento de permeabilidad detectados en la aorta se suman a la hipótesis de que la ausencia de Rcan1 produce un desequilibrio en la pared vascular en ausencia de Rcan1 que, ante un estímulo hipertensivo, conduce al desarrollo de los HIMs. Además, los datos mostrados en este apartado apoyan la hipótesis de que el origen de la sangre es perivascular, y que no existe rotura detectable del endotelio de la aorta. No obstante, los resultados mostrados no han permitido identificar el origen de la sangre, ya que no hemos conseguido detectar *vasa vasorum* en las aortas de ratón. Los datos tampoco permiten concluir que la hemorragia proceda de los vasos de la adventicia.

## 5. Alteración de la homeostasis de la pared vascular en ratones con delección de *Rcan1*: activación de Gsk-3 $\beta$ y p-MLC

### 5.1. La estructura de la pared vascular está comprometida como consecuencia de la delección inducible de *Rcan1*

El efecto tan patente de los tratamientos cortos de Ang-II en los ratones condicionalmente deficientes en Rcan1, sugería que la pared vascular estaba comprometida con anterioridad a la infusión de Ang-II. Dado que mediante análisis histológico no encontramos alteraciones apreciables en los animales en condiciones basales (Fig. 20e), llevamos a cabo estudios de Microscopía Electrónica de Transmisión (MET). Las imágenes obtenidas mostraron aortas de ratones *Rcan1*<sup>+/+</sup> y *Rcan1*<sup>-/-</sup> con uniones célula-célula y célula-elástica bien organizadas y con espacios intercelulares casi inapreciables (Fig. 32a). En contra, el análisis de las aortas de ratones *SM-Rcan1*<sup>-/-</sup> y *EC-Rcan1*<sup>-/-</sup> mostraba grandes espacios entre las CMLVs y las capas de elastina (Fig. 32a). Los espacios intercelulares encontrados en las aortas de animales *SM-Rcan1*<sup>-/-</sup> y *EC-Rcan1*<sup>-/-</sup> parecían estar ocupados por proteínas fibrilares o de matriz extracelular. Sin embargo, tinciones específicas para la detección de colágeno, como la tinción de Masson no mostraron aumento de colágeno (Fig. 24), sugiriendo la posibilidad de que esos

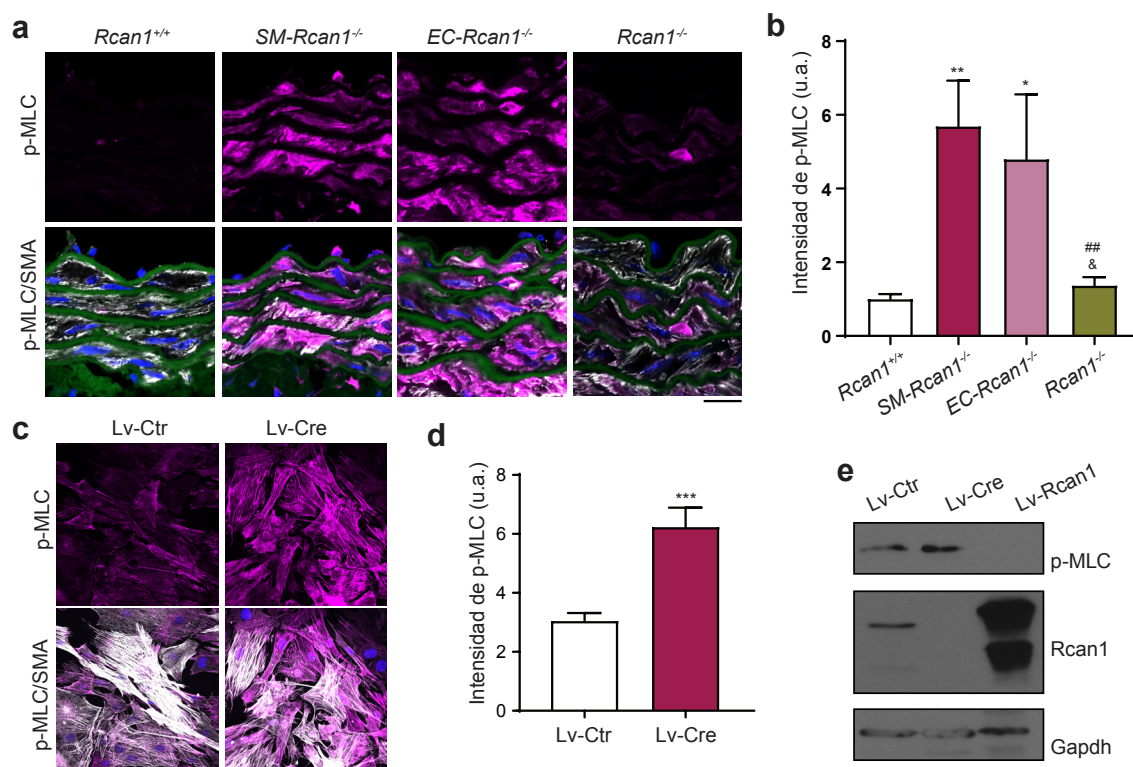
espacios pudieran estar ocupados por otras proteínas extracelulares. Los grandes espacios entre CMLVs y las capas de elastina podrían sugerir pérdida de CMLVs como consecuencia de muerte celular. Sin embargo, tinciones específicas para la detección de apoptosis mostraron ausencia de células apoptóticas en las aortas de *SM-Rcan1<sup>-/-</sup>* y *Rcan1<sup>+/+</sup>* (Fig. 32b). Otra hipótesis que explicase la reducción del área ocupada por las CMLVs sería un aumento del estado de contracción en estos ratones. Analizamos distintos marcadores de contractilidad en músculo liso, no detectando por RT-PCR cuantitativa alteraciones de la actina de músculo liso (*Acta2*), de la cadena pesada de miosina 11 (*Myh11*) o de calponina (*Cnn1*) mediante RT-PCR cuantitativa (Fig. 32c).



**Figura 32.** La delección inducida de *Rcan1* altera la ultra-estructura de la pared vascular. **(a)** Imágenes representativas de la ultra-estructura de la pared vascular mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) de ratones *Rcan1<sup>+/+</sup>* (n=5), *SM-Rcan1<sup>-/-</sup>* (n=5), *EC-Rcan1<sup>-/-</sup>* (n=6) y *Rcan1<sup>-/-</sup>* (n=4). Escala, 2  $\mu$ m. **(b)** Imágenes representativas de tinción fluorescente de apoptosis (rosa) y de núcleos teñidos con DAPI (azul) en aortas de los genotipos indicados (paneles izquierdo y central). El control positivo (Ctr positivo) es una muestra de AAA de genotipo silvestre. Escala, 50  $\mu$ m. **(c)** Niveles relativos de expresión de ARNm de los genes indicados, determinados mediante PCR cuantitativa. Los datos muestran valores obtenidos a partir de ratones individuales (puntos) y la media (barra horizontal larga) y s.e.m. (barras horizontales cortas) de 15 ratones *Rcan1<sup>+/+</sup>*, 18 ratones *SM-Rcan1<sup>-/-</sup>* y 7 ratones *EC-Rcan1<sup>-/-</sup>*.

## 5.2. La delección de *Rcan1* conduce a la fosforilación de la cadena ligera de la miosina (p-MLC)

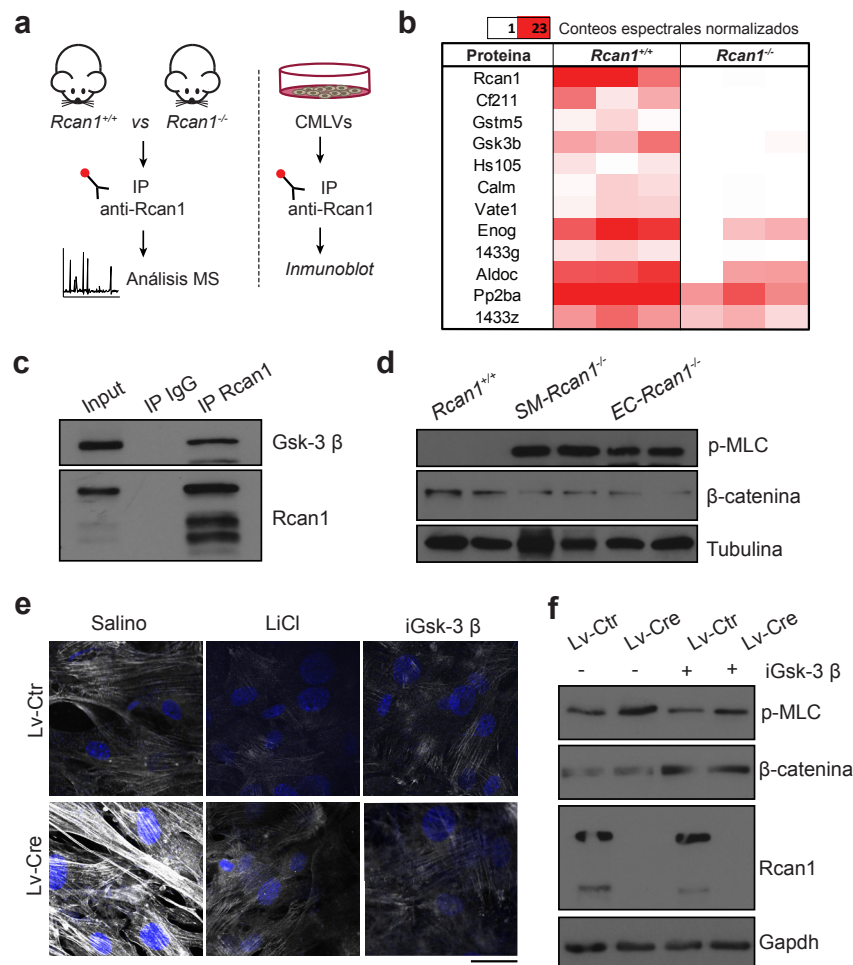
Los datos de MET sobre la ultraestructura de la pared vascular sugerían una alteración de las capa de músculo liso, que recordaba a un estado contraído de la lámina muscular. Asimismo, encontramos un aumento de la fosforilación de la cadena ligera de la miosina (p-MLC), un marcador característico de contractilidad en músculo liso<sup>190</sup>. Este aumento de p-MLC se observaba en aortas de ratones *SM-Rcan1*<sup>-/-</sup> y *EC-Rcan1*<sup>-/-</sup>, y no en las de ratones *Rcan1*<sup>-/-</sup>, que presentaban niveles de p-MLC similares a los animales *Rcan1*<sup>+/+</sup> (Fig. 33a-33b). Una activación similar de MLC se encontraba en CMLVs de genotipo *Rcan1*<sup>loxP/loxP</sup> transducidas con vectores lentivirales codificantes de la expresión de la recombinasa Cre (Lv-Cre) (Fig. 33c-33e). Recíprocamente, la sobre-expresión de *Rcan1* mediante vectores lentivirales (Lv-*Rcan1*) tuvo un efecto inhibitorio sobre la activación de MLC (Fig. 33e).



**Figura 33. La delección inducida de *Rcan1* promueve la fosforilación de la cadena ligera de miosina (p-MLC).** (a) Imágenes representativas de la inmunofluorescencia de p-MLC en secciones aórticas de los genotipos indicados. p-MLC (rosa), SMA (gris), auto-fluorescencia de elásticas (verde) y núcleos teñidos con DAPI (azul). *Rcan1*<sup>+/+</sup> (n=6), *SM-Rcan1*<sup>-/-</sup> (n=6), *EC-Rcan1*<sup>-/-</sup> (n=6) y *Rcan1*<sup>-/-</sup> (n=8). Escala, 20  $\mu$ m. (b) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de p-MLC en (a). One-way ANOVA, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  vs *Rcan1*<sup>+/+</sup>, ## $p < 0,01$  vs *SM-Rcan1*<sup>-/-</sup>, & $p < 0,05$  vs *EC-Rcan1*<sup>-/-</sup>. (c) Imágenes representativas de la inmunofluorescencia de p-MLC en CMLVs en cultivo de genotipo *Rcan1*<sup>loxP/loxP</sup> transducidas con vectores lentivirales codificantes de la recombinasa Cre (Lv-Cre). p-MLC (rosa), SMA (gris) y núcleos teñidos con DAPI (azul). Escala, 20  $\mu$ m. (d) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de p-MLC en (c). T-test, \*\*\* $p < 0,001$  vs Lv-Ctr. Los datos son la media+s.e.m de 8 replicados de cada condición distribuidos en 3 experimentos independientes. (e) Immunoblots representativos (n=3) de p-MLC, *Rcan1* y Gapdh (control de carga) en CMLVs de animales *Rcan1*<sup>loxP/loxP</sup> transducidas con vectores lentivirales codificantes de Cre (Lv-Cre), *Rcan1* (Lv-*Rcan1*) o GFP como vector control (Lv-Ctr).

### 5.3. La activación de MLC está mediada por Gsk-3 $\beta$

El mecanismo por el que la deficiencia de Rcan1 conduce a la de inducción de p-MLC fue analizado más en profundidad *in vitro*. Para ello, se llevó a cabo una estrategia de identificación de posibles interactores de Rcan1 que pudieran formar parte de las rutas de señalización implicadas. Inicialmente, usamos extractos proteicos de cerebro de animales *Rcan1<sup>+/+</sup>* y *Rcan1<sup>-/-</sup>* que inmunoprecipitamos con anticuerpo anti-Rcan1. Analizamos estos inmunoprecipitados mediante espectrometría de masas para identificar el interactoma de Rcan1. Las proteínas identificadas como interactores potenciales fueron posteriormente validadas por *immunoblot* (Fig. 34a).



**Figura 34.** La delección inducida de *Rcan1* activa MLC a través de Gsk-3  $\beta$ . **(a)** Diseño experimental. Inmunoprecipitación de extractos proteicos de cerebro de ratones *Rcan1<sup>+/+</sup>* y *Rcan1<sup>-/-</sup>* con anticuerpo anti-Rcan1 e identificación de interactores por espectrometría de masas y cuantificación por conteo espectral. **(b)** Proteínas enriquecidas significativamente (T-test,  $p < 0,05$ ) identificadas en inmunoprecipitado de *Rcan1<sup>+/+</sup>* respecto a *Rcan1<sup>-/-</sup>* ordenadas de mayor a menor enriquecimiento en 3 experimentos independientes. **(c)** *Immunoblot* representativo ( $n=4$ ) de Gsk-3  $\beta$  y Rcan1 de extractos de CMLVs inmunoprecipitados con un anticuerpo anti-Rcan1 (IP Rcan1) o con un anticuerpo control (IP IgG) comparado con el extracto inicial (Input). **(d)** *Immunoblot* representativo ( $n=3$ ) de p-MLC,  $\beta$ -catenina y tubulina (control de carga) de extractos de aortas de ratones *Rcan1<sup>+/+</sup>*, *SM-Rcan1<sup>-/-</sup>* y *EC-Rcan1<sup>-/-</sup>*. **(e)** Imágenes representativas ( $n=3$ ) de inmunofluorescencia p-MLC (gris) y núcleos teñidos con DAPI (azul) de CMLVs de genotipo *Rcan1<sup>loxP/loxP</sup>* transducidas con vectores lentivirales codificantes de Cre (Lv-Cre) o virus control (Lv-Ctr) y tratadas 2h con los inhibidores de Gsk-3  $\beta$ : LiCl (50 $\mu$ M) e inhibidor VII (iGsk-3  $\beta$ , 10 $\mu$ M). Escala, 20  $\mu$ m. **(f)** *Immunoblot* representativo ( $n=3$ ) de Rcan1, p-MLC,  $\beta$ -catenina y Gapdh de las CMLVs referidas en (e).

Proteína	Promedio Rcan1 <sup>+/+</sup>	Promedio Rcan1 <sup>-/-</sup>	Veces enriquecido	p valor
Hba	4	0	-	0,3383
<b>Rcan1</b>	22	0	50,30	0,0086
Cf211	8	0	37,55	0,0484
Gstm5	2,85	0,22	13,11	0,04
Gsk3a	3,54	0,29	12,28	0,07
Gsk3b	9,72	0,79	12,26	0,01
Hs105	2,71	0,29	9,42	0,03
Tau	2,65	0,29	9,21	0,07
Calm	3,69	0,43	8,49	0,04
Kcy	2,59	0,43	5,97	0,20
Vate1	4,16	0,72	5,76	0,02
Arpc4	3,85	0,87	4,43	0,10
Enog	18,78	4,77	3,94	0,01
Tcpz	3,42	0,87	3,93	0,06
Bach	3,22	0,87	3,71	0,12
Canb1	22,25	6,06	3,67	0,12
Scot1	2,65	0,72	3,67	0,21
1433g	3,79	1,06	3,59	0,00
Cor1a	3,05	1,01	3,01	0,11
Hs90b	3,61	1,30	2,78	0,11
Gdir1	2,61	0,94	2,78	0,09
Aldoc	17,03	6,21	2,74	0,03
Ldha	8,04	2,97	2,71	0,13
Pp2bb	9,93	3,68	2,69	0,08
Ldhb	11,42	4,24	2,69	0,07
Anxa7	2,52	0,94	2,68	0,23
At1b1	3,56	1,37	2,59	0,10
Syn1	11,38	4,40	2,58	0,10
Gdia	10,41	4,12	2,53	0,05
Hs90a	7,98	3,18	2,51	0,25
Gltf	4,17	1,66	2,51	0,18
Pp2ba	31,32	12,51	2,50	0,00
Mdhc	9,61	4,08	2,36	0,11
Idhc	3,07	1,30	2,35	0,28
Stxb1	16,82	7,49	2,25	0,09
Sh3g2	3,81	1,73	2,20	0,13
Caza2	3,30	1,52	2,18	0,19
Kcru	3,91	1,81	2,16	0,23
1433e	3,85	1,80	2,13	0,11
Arpc3	2,75	1,30	2,11	0,42
Cnnp1	2,58	1,23	2,10	0,25
Rssa	2,54	1,23	2,07	0,52
Map1b	4,32	2,09	2,06	0,33

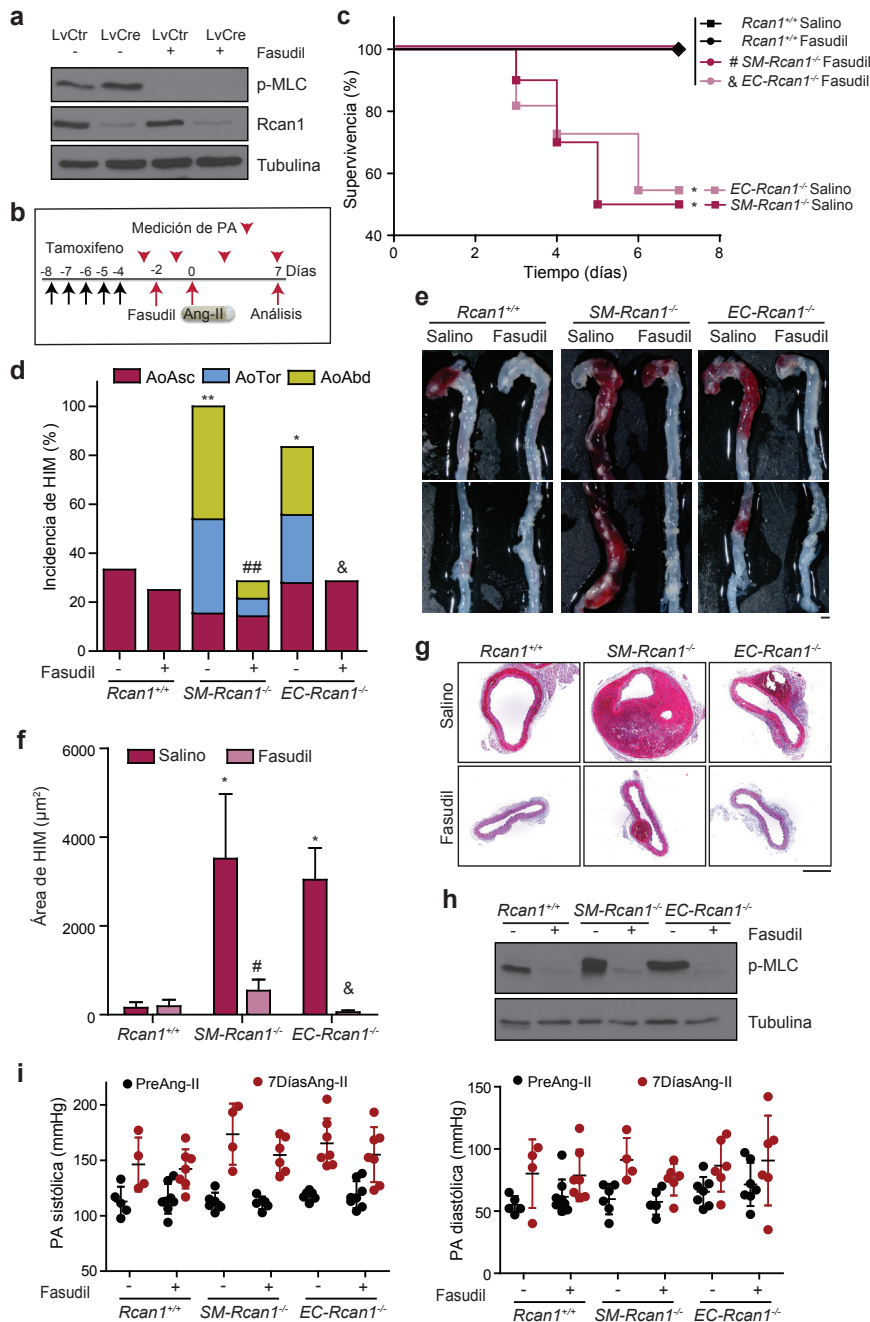
Tabla 9. Proteínas identificadas mediante espectrometría de masas en las inmunoprecipitaciones de Rcan1 enriquecidas más de 2 veces en lisados de ratones Rcan1<sup>+/+</sup> respecto a los de ratones Rcan1<sup>-/-</sup>. Se indica el p valor por análisis estadístico T-test. Datos integrados de 3 experimentos independientes.

El análisis proteómico identificó a Gsk-3  $\beta$  como uno de los principales interactores de Rcan1 (Fig. 34b y Tabla9), una interacción que ya había sido descrita en estudios previos<sup>118</sup>. Asimismo, con anterioridad se había determinado un papel potencial de Gsk-3  $\beta$  sobre la ruta de RhoA y la activación de MLC<sup>191,192</sup>. Por ello, validamos la interacción de Rcan1 con Gsk-3  $\beta$  mediante la inmunoprecipitación de Rcan1 en CMLVs (Fig. 34c). Además, detectamos un ligero aumento de la actividad de Gsk-3  $\beta$  en extractos aórticos de ratones *SM-Rcan1*<sup>-/-</sup> y *EC-Rcan1*<sup>-/-</sup>, donde se observaba una disminución de los niveles de  $\beta$ -catenina, indicativos de un aumento en la actividad Gsk-3  $\beta$ <sup>193,194</sup>, que correlacionaban con el aumento en los niveles de p-MLC (Fig. 34d). Para analizar la implicación de Gsk-3  $\beta$  en la activación de p-MLC, usamos CMLVs de genotipo *Rcan1*<sup>loxP/loxP</sup> transducidas con Lv-Cre y las tratamos con inhibidores conocidos de Gsk-3  $\beta$  como el LiCl<sup>195</sup> o el inhibidor VII<sup>196</sup> (iGsk-3  $\beta$ ). La inhibición farmacológica de Gsk-3  $\beta$  mostró una reducción de los niveles de p-MLC tanto por inmunofluorescencia (Fig. 34e) como por *immunoblot* (Fig. 34f), previniendo el aumento de p-MLC por deficiencia de Rcan1.

#### 5.4. La inhibición farmacológica de Rock previene la activación de MLC y la formación de HIMs y DAs letales

Los resultados anteriores indicaban que la ausencia de Rcan1 se traduce en un aumento de la actividad de Gsk-3  $\beta$ , que a su vez, podría activar la fosforilación de la MLC. El estado de fosforilación de MLC está controlado por un equilibrio entre las quinasas y fosfatasas que la regulan, pero sin duda la activación de la ruta de RhoA juega un papel esencial en su activación<sup>85</sup>. Mientras que MLC no se ha descrito como diana directa de Gsk-3  $\beta$ , sí se ha sugerido que la posible activación de la ruta de RhoA-Rock por fosforilación esté mediada por Gsk-3  $\beta$ <sup>191,192</sup>. Por ello decidimos determinar la implicación de RhoA-Rock en la regulación de p-MLC en este modelo. El tratamiento de CMLVs con el inhibidor de Rock Fasudil consiguió prevenir la activación de la MLC en las células *Rcan1*<sup>loxP/loxP</sup> tras la infección con Lv-Cre (Fig. 35a), resaltando la importancia del papel de Rock como inductor p-MLC en nuestro modelo. Para estudiar el efecto biológico del aumento de p-MLC en las aortas de los ratones deficientes en Rcan1, administramos Fasudil a animales *Rcan1*<sup>+/+</sup>, *SM-Rcan1*<sup>-/-</sup> y *EC-Rcan1*<sup>-/-</sup> dos días antes del tratamiento con Ang-II (Fig. 35b). El tratamiento con el inhibidor de Rock previno las muertes por DA en ambos casos, mientras que los ratones no tratados presentaron mortalidad similar a los experimentos anteriores (Fig. 35c). Además de la prevención de la letalidad inducida por AngII, la incidencia de HIM disminuyó drásticamente con el tratamiento con Fasudil en ratones *SM-Rcan1*<sup>-/-</sup> y *EC-Rcan1*<sup>-/-</sup> tratados con Fasudil (Fig. 35d). A pesar de que sí se detectaron HIMs en los ratones tratados con Fasudil, las lesiones eran más pequeñas y significativamente menos severas, como se pudo apreciar mediante la observación macroscópica de las aortas (Fig. 35e), la cuantificación del área de la hemorragia (Fig. 35f) o el análisis histológico de las secciones (Fig. 35g).

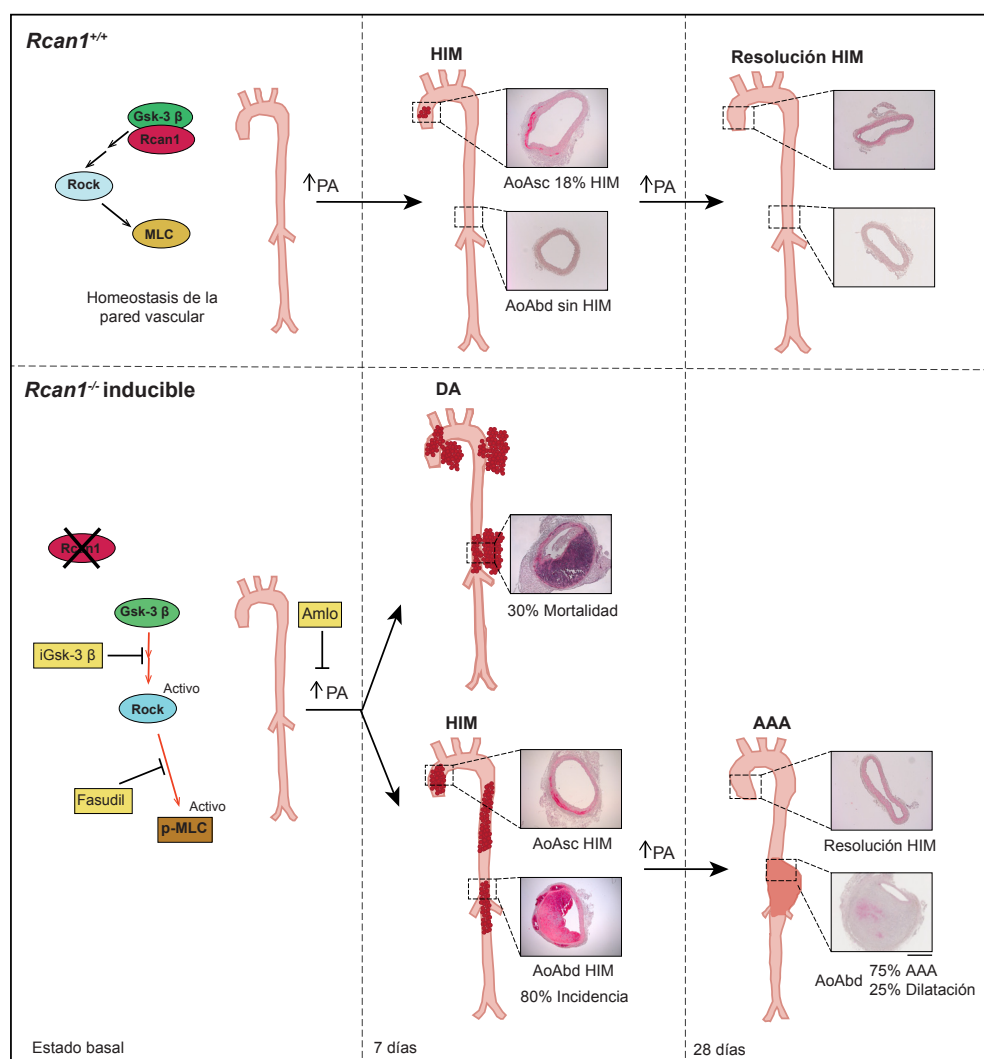
## Resultados



**Figura 35. MLC es mediador de la formación de HIMs y su inhibición con Fasudil previene la letalidad.** (a) *Immunoblot* representativo (n=3) de p-MLC, Rcan1 y tubulina en CMLVs de genotipo  $Rcan1^{loxP/loxP}$  transducidas con lentivirus codificante de Cre (Lv-Cre) o con lentivirus control (Lv-Ctr) tras 1h de tratamiento con el inhibidor de Rock Fasudil (30  $\mu$ M) (b) Esquema experimental. Las flechas negras indican los tiempos de administración de tamoxifeno. Flechas rojas, principio y fin de administración de Ang-II (1 $\mu$ g/kg/min) y Fasudil (1 mg/mL en agua de bebida). (c) Curva de supervivencia de ratones de los genotipos y tratamientos indicados, de acuerdo al esquema en (b). Salino = Ang-II:  $Rcan1^{+/+}$  (n=7),  $SM-Rcan1^{-/-}$  (n=10) y  $EC-Rcan1^{-/-}$  (n=7); Fasudil = Fasudil + Ang-II:  $Rcan1^{+/+}$  (n=8),  $SM-Rcan1^{-/-}$  (n=7) y  $EC-Rcan1^{-/-}$  (n=7). Test Log-rank (Mantel-Cox), \*p<0,05 vs  $Rcan1^{+/+}$  Ang-II (Salino); #p<0,05 vs  $SM-Rcan1^{-/-}$  Ang-II (Salino); &p<0,05 vs  $EC-Rcan1^{-/-}$  Ang-II (Salino). (d) Incidencia de HIM en estos mismo ratones. Distribución Chi-cuadrada, \*p<0,05; \*\*p<0,01 vs  $Rcan1^{+/+}$  Ang-II (Fasudil -); ###p<0,01 vs  $SM-Rcan1^{-/-}$  Ang-II (Fasudil -); &p<0,05 vs  $EC-Rcan1^{-/-}$  Ang-II (Fasudil -). (e) Imágenes macroscópicas representativas de los HIMs de los ratones en (c-d). Escala, 1 mm. (f) Cuantificación del área ocupada por los HIMs en secciones aórticas de los ratones anteriores (media + s.e.m.). *Two-way ANOVA*, \*p<0,05 vs  $Rcan1^{+/+}$  Ang-II (Salino); #p<0,05 vs  $SM-Rcan1^{-/-}$  Ang-II (Salino); &p<0,05 vs  $EC-Rcan1^{-/-}$  Ang-II (Salino). (g) Imágenes representativas de las secciones aórticas teñidas con HE de los ratones anteriores. Escala, 500  $\mu$ m. (h) *Immunoblot* representativo (n=2) de p-MLC y Tubulina en extractos aórticos de los ratones en (c-g). (i) PA sistólica (izquierda) y diastólica (derecha) en los ratones y tratamientos indicados medida a tiempo inicial (PreAng-II) y al final del experimento (7DíasAng-II).

El efecto del tratamiento sobre la inhibición de p-MLC se comprobó a tiempo final en extractos de aorta total mediante *immunoblot* (Fig. 35h). Como dato adicional, el tratamiento con Fasudil no tuvo ningún efecto sobre la PA (Fig. 35i), de manera que el efecto preventivo sobre los HIMs no se debe en ningún caso a efectos sobre la hipertensión. El efecto preventivo del Fasudil sobre las lesiones aórticas en ratones *SM-Rcan1<sup>-/-</sup>* y *EC-Rcan1<sup>-/-</sup>* sugiere que el eje RhoA-Rock/p-MLC es mediador clave en la formación de HIMs en este modelo.

En su conjunto, todos los resultados incluidos en este apartado indican que la delección inducible de *Rcan1* produce cambios en la homeostasis del vaso, con una activación de la ruta de Gsk-3  $\beta$  que a su vez conduce a la fosforilación de MLC mediada por la activación de RhoA-Rock. En esta situación, la aorta responde a situaciones de hipertensión desarrollando HIMs, que en muchos casos culminan en muerte por DA y en otros se cronifican y progresan hacia AAA (Fig. 36).



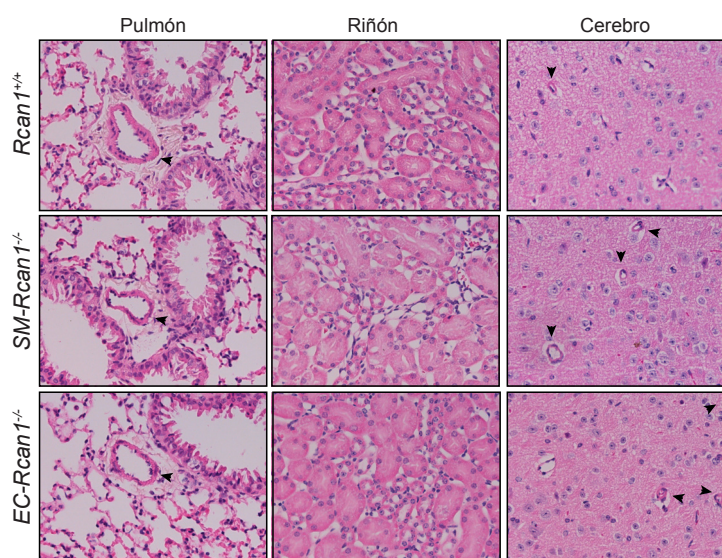
**Figura 36. Esquema de evolución temporal del fenotipo aórtico y mecanismo molecular propuesto.** La ausencia inducida de *Rcan1* activa la ruta de Gsk-3  $\beta$  que a su vez induce la fosforilación de MLC, alterando la homeostasis de la pared vascular. El aumento de la PA desencadena lesiones en la aorta, desarrollando HIM, que en muchos casos culminan en muerte por rotura aórtica, y en otros cronifican en el tiempo hasta generar AAA.

## 6. Los efectos de la delección de *Rcan1* en otros tejidos no aórticos

Uno de los aspectos más sorprendentes del modelo de HIM promovido por la delección de *Rcan1* es su gran incidencia y severidad. Considerando las consecuencias de que la deficiencia de *Rcan1* tiene tanto en músculo liso como en endotelio aórtico, una pregunta interesante que nos planteamos es estudiar los efectos de la delección condicional en otros vasos o en otros tejidos enriquecidos en CMLVs o de CEs.

### 6.1. No se detectan HIMs en otros tejidos diferentes de la aorta

El fenotipo aórtico tan agudo de los ratones con deficiencia inducida de *Rcan1* era indicativo de un papel esencial de *Rcan1* en el mantenimiento de la homeostasis de la pared vascular. Además, la hipótesis de los vasos perivasculares como origen de la hemorragia, sugería la implicación de otros vasos de menor calibre en la patología. Sin embargo, el análisis de otros tejidos muy vascularizados no mostró HIMs, aneurismas ni indicios de daño vascular de otro tipo. En concreto, analizamos pulmones, riñones y cerebros de ratones con HIMs, y en ningún caso se observamos hemorragia ni alteración en los vasos de estos tejidos (Fig. 37).

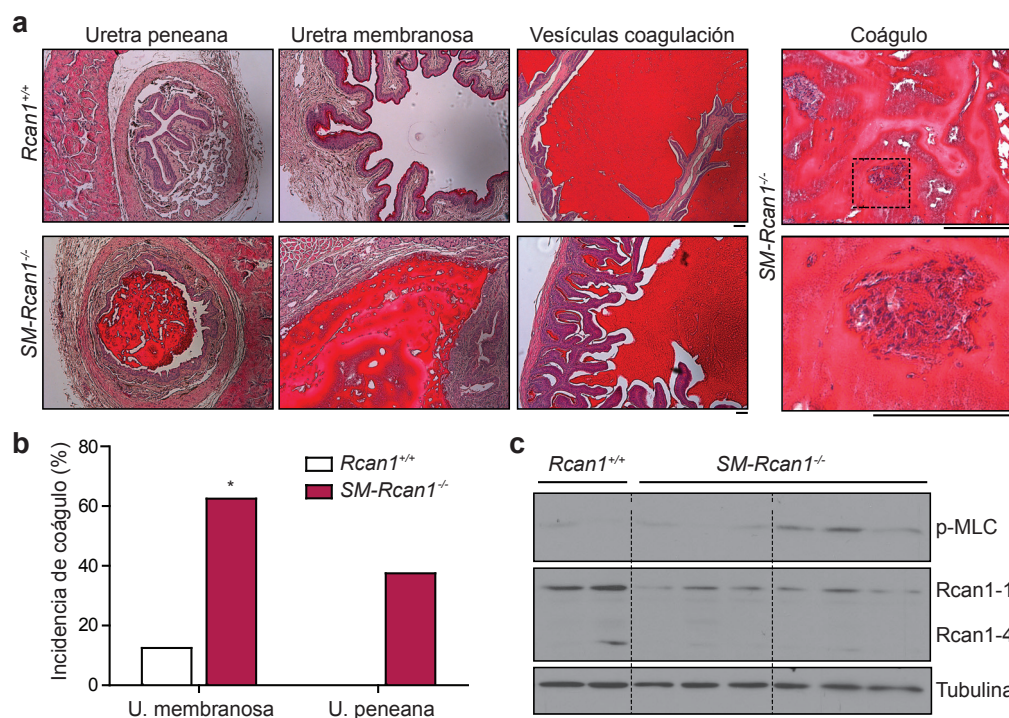


**Figura 37. Ausencia de lesiones vasculares en vasos menores que la aorta.** Imágenes de secciones teñidas con HE de pulmón (izquierda), riñón (centro) y cerebro en la zona del parénquima (derecha) y en los genotipos indicados tras 7 días de tratamiento con Ang-II. Las puntas de flecha señalan vasos sanguíneos de pequeño calibre. Escala, 100 µm.

### 6.2. La delección condicional de *Rcan1* produce alteraciones en el músculo liso del aparato reproductor y urinario masculino

Al margen de los vasos sanguíneos, existen otros tejidos enriquecidos en músculo liso, que también son deficientes en *Rcan1* en los animales *SM-Rcan1<sup>-/-</sup>*. Concretamente, algunos animales *SM-Rcan1<sup>-/-</sup>* mostraron algunas anomalías en el aparato reproductor y urinario en condiciones basales. La mayoría de los machos *SM-Rcan1<sup>-/-</sup>* analizados por necropsia presentaron coágulos blanquecinos a lo largo de la uretra, que en ocasiones recorrían desde el cuello de la vejiga hasta el pene. El análisis histológico de estos animales revelaba coagulaciones de líquido

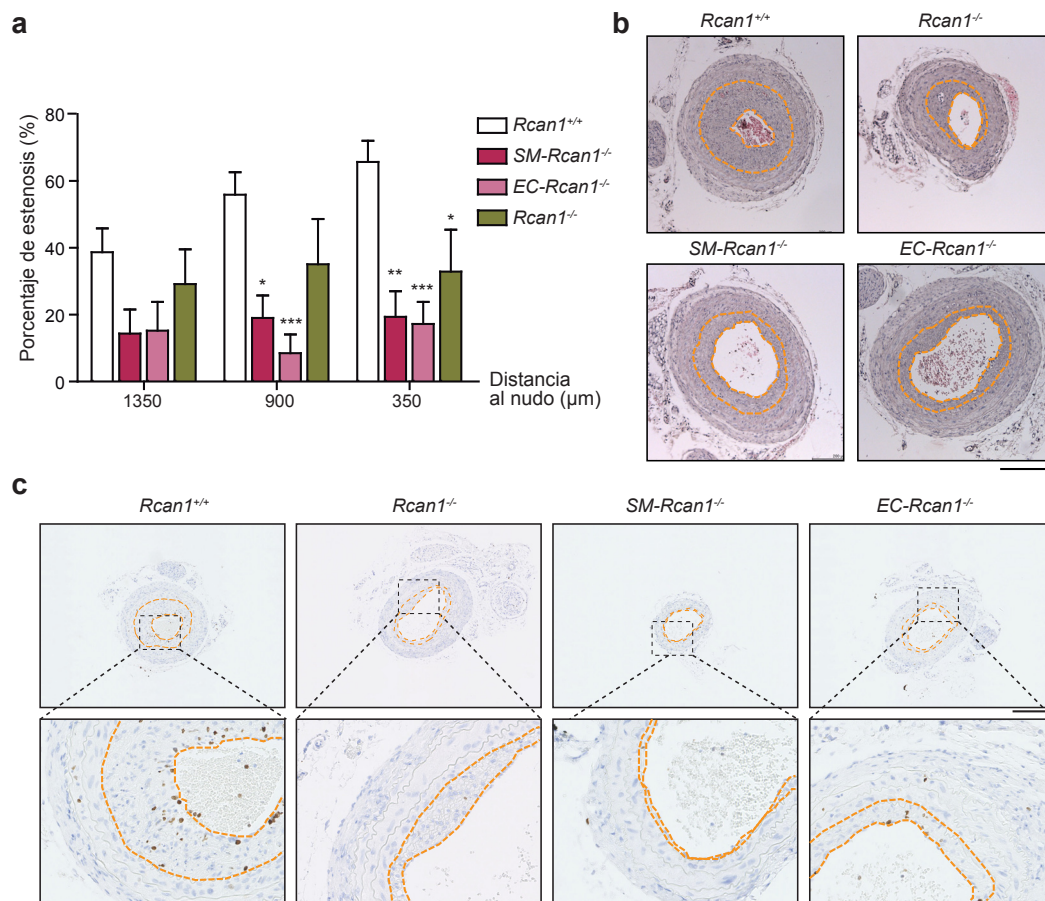
seminal a lo largo de la uretra, desde la uretra peneana, pasando por la zona membranosa de la uretra hasta la vejiga (Fig. 38a). El análisis de las vesículas de coagulación parecía indicar que estaban hipertrofiadas y sugería déficit en el líquido de coagulación. El análisis histológico de los coágulos encontrados indicaba la presencia de células de pequeño tamaño de morfología similar a espermatozoides (Fig. 38a). La presencia de coágulos o tapones era significativamente más frecuente en la uretra membranosa, próxima a la vejiga, mientras que en la uretra peneana aparecían con menor frecuencia (Fig. 38b). El estudio por *immunoblot* de la proteína total en la vejiga indicaba una reducción en la expresión de Rcan1, como cabía esperar dado su gran contenido en músculo liso. Además, algunos de los animales estudiados presentaban una inducción de p-MLC en la vejiga (Fig. 38c). Estos resultados sugieren que la ausencia de Rcan1 juega un papel homeostático en la contractilidad del músculo liso de la vejiga y posiblemente también de la uretra. La contracción del músculo liso en el cuello de la vejiga es un mecanismo necesario para evitar la eyaculación retrógrada<sup>197</sup>. Es ciertamente aceptado que fallos en este mecanismo autónomo de contracción del cuello de la vejiga puede producir la presencia de eyaculado en las vías urinarias<sup>198</sup>. En el caso del ratón, el eyaculado contiene la proteína de coagulación, responsable de que se coagule y forme el tapón en la vagina de la hembra. Una desregulación en los mecanismos de contracción de músculo liso en las vías repro-urinarias es consistente con la presencia de estos coágulos o tapones de material seminal.



**Figura 38. Los ratones *SM-Rcan1*<sup>-/-</sup> presentan coágulos en la uretra. (a)** Imágenes representativas de secciones teñidas con HE de la uretra peneana (izquierda) o membranosa (centro) y de las vesículas de coagulación (derecha). En el extremo derecho se representan secciones teñidas con HE de coágulo obtenido de la uretra de un animal *SM-Rcan1*<sup>-/-</sup>. El recuadro punteado en la imagen superior se muestra ampliado en la parte inferior. Escalas, 50  $\mu$ m. **(b)** Incidencia de coágulo detectado en la uretra membranosa (cerca a la vejiga) o peneana (pene) en los ratones *Rcan1*<sup>+/+</sup> (n=8) y *SM-Rcan1*<sup>-/-</sup> (n=8). Two-way ANOVA, \*p<0,05 vs *Rcan1*<sup>+/+</sup>. **(c)** *Immunoblot* representativo (n=2) de p-MLC, Rcan1 y Tubulina en extractos proteicos de vejiga de animales *Rcan1*<sup>+/+</sup> y *SM-Rcan1*<sup>-/-</sup>.

## Papel de Rcan1 en formación de neointima

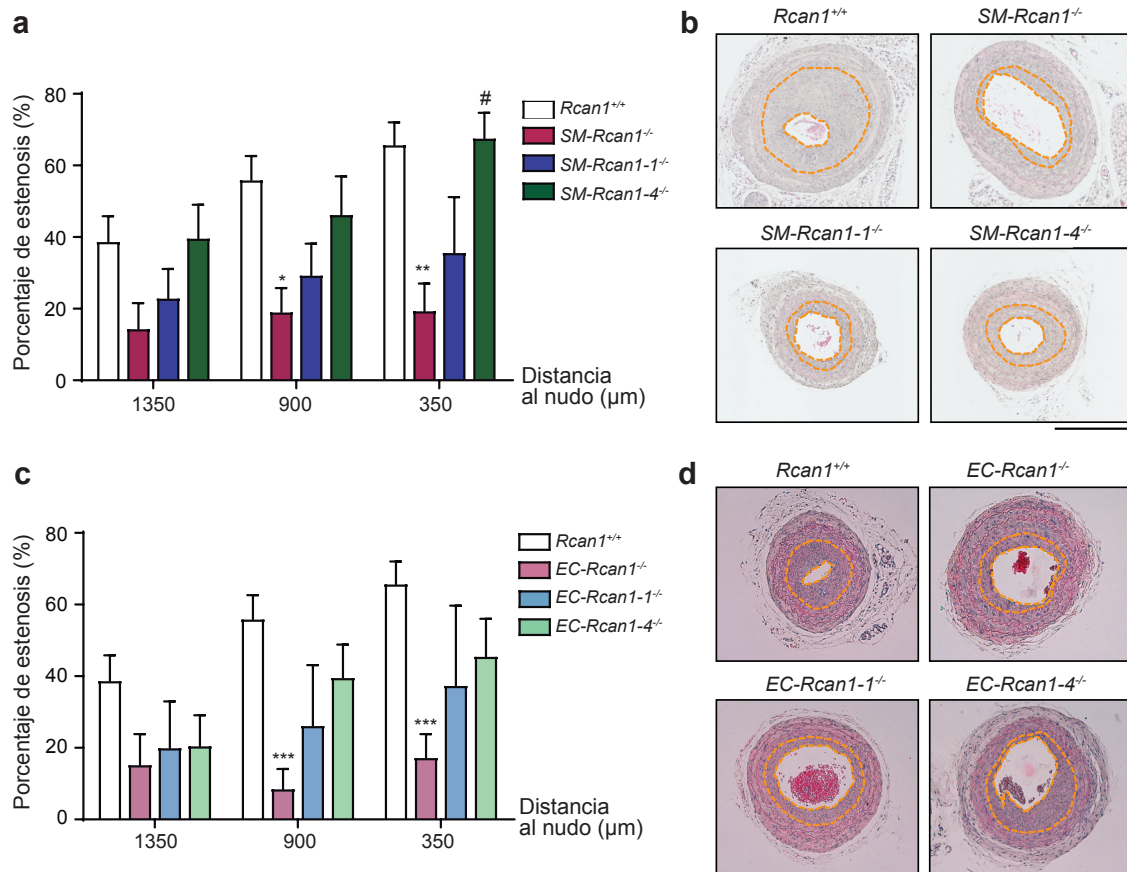
De forma paralela al modelo de formación de HIM y de AAA por infusión de Ang-II, nos planteamos estudiar un segundo modelo de remodelado vascular donde el daño mecánico fuese la causa principal. Para ello, realizamos cirugía de ligación de carótida con la que inducir la formación de neointima en los ratones deficientes en las isoformas de Rcan1 de forma inducible y condicional de tejido. En este modelo, los cambios hemodinámicos producidos por la ligación generan el daño vascular y la formación de neointima<sup>76</sup>. Experimentos preliminares revelaron que la ligación de carótida inducía una formación de neointima muy leve, siendo difícil apreciar bien la patología. Por ello, combinamos la ligación de carótida con la infusión de Ang-II a dosis baja (0,5µg/kg/min) para exacerbar el efecto. Este tratamiento con Ang-II a 0,5µg/kg/min no aumentó la PA, y tampoco generó lesiones aórticas ni efectos letales.



**Figura 39. La ausencia de Rcan1 inhibe la formación de neointima.** (a) Cuantificación de estenosis de la arteria carótida mostrada, a las distancias del nudo indicadas, como porcentaje del lumen ocupado por la neointima (media + s.e.m.). *Two-way ANOVA*, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  vs *Rcan1*<sup>+/+</sup>. (b) Imágenes representativas de secciones de carótidas de (a) teñidas con HE a tiempo al final del experimento. Las líneas amarillas delimitan la neointima. Escala, 200 µm. (c) Imágenes representativas de inmunohistoquímica de Ki67 (marrón) en secciones de carótida de (a) y (b). Escala, 200 µm. *Rcan1*<sup>+/+</sup> (n=16), *SM-Rcan1*<sup>-/-</sup> (n=6), *EC-Rcan1*<sup>-/-</sup> (n=6) y *Rcan1*<sup>-/-</sup> (n=6).

## 1. La ausencia de *Rcan1* protege de la formación de neointima

Grupos de ratones *Rcan1*<sup>+/+</sup>, *SM-Rcan1*<sup>-/-</sup>, *EC-Rcan1*<sup>-/-</sup> y *Rcan1*<sup>-/-</sup> fueron sometidos a cirugía de ligación de la carótida izquierda. En el momento de la cirugía, se les implantó una mini-bomba de infusión osmótica para la administración de Ang-II. Al cabo de 21 días, analizamos histológicamente las carótidas. Para la valoración de la estenosis, se cuantificó el área de neointima como el área contenida entre el endotelio y la lámina elástica interna; y el área del lumen si no existiese patología (área delimitada por la lámina elástica interna). El porcentaje de estenosis se expresó como porcentaje de oclusión del lumen, o el porcentaje del área inicial del lumen que fue ocupado por la neointima. Los datos mostraron que la delección de *Rcan1* inducida en músculo liso o endotelio, al igual que su delección constitutiva, conferían protección frente a la formación de neointima cuando la comparamos con ratones *Rcan1*<sup>+/+</sup> (Fig. 39a-39b). Además, la proliferación de las células que ocupan la neointima se veía aumentada en los animales *Rcan1*<sup>+/+</sup> (Fig. 39c).



**Figura 40. La delección de una sola isoforma de *Rcan1* en endotelio o en músculo liso presenta una tendencia protectora frente a la formación de neointima.** (a) Cuantificación de la estenosis inducida por formación de neointima en la arteria carótida en ausencia de *Rcan1* en el músculo liso. *Two-way ANOVA*, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; vs *Rcan1*<sup>+/+</sup>. # $p < 0,05$ ; vs *SM-Rcan1*<sup>-/-</sup>. (b) Imágenes representativas de tinción HE de secciones de las carótidas ligadas de los animales referidos en (a). Escala, 200 μm. (c) Cuantificación de la estenosis inducida por formación de neointima en la arteria carótida en ausencia de *Rcan1* en el endotelio. *Two-way ANOVA*, \*\*\* $p < 0,001$ ; vs *Rcan1*<sup>+/+</sup>. (d) Imágenes representativas de tinción HE de secciones de las carótidas ligadas de los animales referidos en (c). Escala, 200 μm. *Rcan1*<sup>+/+</sup> (n=16), *SM-Rcan1*<sup>-/-</sup> (n=6), *SM-Rcan1-1*<sup>-/-</sup> (n=5), *SM-Rcan1-4*<sup>-/-</sup> (n=6), *EC-Rcan1*<sup>-/-</sup> (n=6), *EC-Rcan1-1*<sup>-/-</sup> (n=5) y *EC-Rcan1-4*<sup>-/-</sup> (n=7).

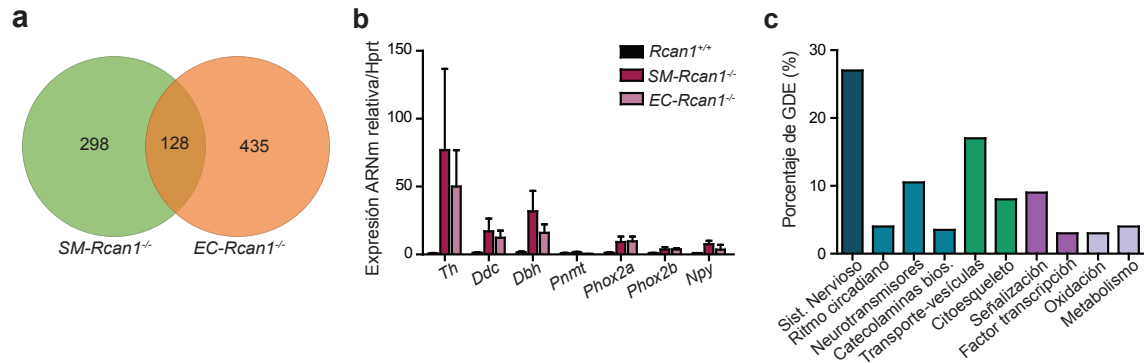
### 2. La delección de *Rcan1-1* o de *Rcan1-4* protege frente a la formación de neoíntima

Posteriormente, se realizaron experimentos para comprobar el papel de cada isoforma en la formación de neoíntima. Sometimos a cirugía de ligación de carótida a ratones *SM-Rcan1-1<sup>-/-</sup>*, *SM-Rcan1-4<sup>-/-</sup>*, *EC-Rcan1-1<sup>-/-</sup>* y *EC-Rcan1-4<sup>-/-</sup>* junto con a sus controles de tipo celular *SM-Rcan1<sup>-/-</sup>* y *EC-Rcan1<sup>-/-</sup>* y a ratones *Rcan1<sup>+/+</sup>*. De forma análoga al modelo de HIMs, la delección de cada isoforma por separado tuvo un efecto similar que no llegó a ser estadísticamente significativo, y que fue inferior a la delección conjunta de ambas isoformas (Fig. 40). Estos datos se observaban en la delección condicional en músculo liso (Fig. 40a-40b) o en endotelio (Fig. 40c-40d), que en ambos casos fue suficiente para conseguir el efecto protector frente a la formación de neoíntima.

### Identificación de genes comúnmente regulados en la aorta de ratones con delección inducida de *Rcan1* en endotelio y músculo liso

La fuerte similitud entre los fenotipos de las delecciones condicionales en músculo liso y en endotelio en los modelos patológicos analizados ha alimentado la hipótesis de la existencia de una comunicación importante entre CMLVs y CEs en el contexto de la pared arterial dependiente de *Rcan1*. Para explorar los mecanismos moleculares responsables de tal comunicación, nos planteamos realizar estudios de secuenciación de ARNm (*RNAseq*). Para ello, el transcriptoma de aortas de animales *SM-Rcan1<sup>-/-</sup>* y *EC-Rcan1<sup>-/-</sup>* fue comparado con el de aortas de animales *Rcan1<sup>+/+</sup>*. Se encontraron 298 genes diferencialmente expresados (GDE) en el genotipo *SM-Rcan1<sup>-/-</sup>* y 435 en *EC-Rcan1<sup>-/-</sup>*, de los cuales 128 eran comunes a ambos (Fig. 41a). Sorprendentemente, encontramos una activación transcripcional de genes responsables de la biosíntesis de catecolaminas: Hidroxilasa de la tirosina (*Th*, *Tyrosine Hydroxylase*), Descarboxilasa de DOPA (*Ddc*, *DOPA Decarboxylase*) o Beta-hidroxilasa de la Dopamina (*Dbh*, *Dopamine hydroxylase*). Los datos fueron verificados mediante RT-PCR cuantitativa en algunos de estos genes (Fig. 41b). Sin embargo, no detectamos una regulación diferencial en la traducción a nivel de proteína. Realizamos un análisis de los procesos biológicos asociados a los GDE mediante el programa "Ingenuity" (Fig. 41c). Sorprendentemente, más de un 25% de los GDE comunes a animales *SM-Rcan1<sup>-/-</sup>* y *EC-Rcan1<sup>-/-</sup>* se identificaban como genes con funciones en el sistema nervioso. Un porcentaje importante de estos genes están relacionados con funciones de transporte de vesículas, neurotransmisores y mecanismos del citoesqueleto, igualmente implicados en la movilización de exosomas y vesículas.

Independientemente de su asociación con el sistema nervioso, la identificación de estas rutas y mecanismos constituyen la base para futuras investigaciones sobre la comunicación Rcan1-dependiente entre CMLVs y CE responsable del equilibrio de la pared vascular.



**Figura 41. La delección inducida de *Rcan1* en músculo liso o endotelio promueve la regulación de genes implicados en diversos procesos celulares.** Análisis mediante *RNAseq* de la expresión de ARNm en aortas de ratones *Rcan1<sup>+/+</sup>*, *SM-Rcan1<sup>-/-</sup>* y *EC-Rcan1<sup>-/-</sup>* (3 aortas por cada genotipo por triplicado, empleándose 9 aortas de cada genotipo en total). **(a)** Diagrama de Venn mostrando el número de genes diferencialmente expresados (GDE) en aortas de animales *SM-Rcan1<sup>-/-</sup>* (verde) y *EC-Rcan1<sup>-/-</sup>* (naranja) respecto a animales silvestres. De todos los GDE, 128 son comunes a ambas condiciones. **(b)** Validación mediante PCR cuantitativa de algunos genes identificados como GDE con ARNm de aortas *Rcan1<sup>+/+</sup>*, *SM-Rcan1<sup>-/-</sup>* y *EC-Rcan1<sup>-/-</sup>*. La expresión se normalizó respecto a la expresión del gen *Hprt*. **(c)** Análisis mediante *software* Ingenuity (IPA) de los procesos biológicos atribuidos a los GDE, representados como el porcentaje de genes en cada grupo o proceso biológico.



# Discusión





## Los ratones con delección inducible de *Rcan1*: un modelo prometedor que recapitula el HIM en la enfermedad humana

El remodelado de la estructura de la pared vascular es el común denominador de las enfermedades vasculares. La alteración de la homeostasis del vaso conduce al desarrollo de problemas vasculares, en muchos casos con complicaciones graves, pudiendo llegar a provocar incluso la muerte. Los HIMs pueden evolucionar de diversas maneras, bien hacia su resolución por reabsorción, o bien hacia complicaciones mayores. Entre estos problemas podemos distinguir entre la situación aguda, lo cual implica la DA y la muerte que puede causar, o la situación crónica en la cual la aorta sufre una remodelación adicional hasta la formación de aneurismas<sup>56,57,60,187,199,200</sup>. En este estudio presentamos por primera vez un modelo en ratón de HIM con alta penetrancia que se asemeja muy fielmente a la enfermedad humana. Aproximadamente el 35% de los ratones *Ubc-Rcan1*<sup>-/-</sup>, el 30% de los *SM-Rcan1*<sup>-/-</sup> y el 20% de los *EC-Rcan1*<sup>-/-</sup> evolucionan de forma aguda y mueren por ruptura aórtica en los primeros 7 días de hipertensión sostenida. Los supervivientes, en la mayoría de los casos, progresan a largo plazo hacia una dilatación aórtica principalmente abdominal, y aproximadamente el 60-70% de estos animales desarrollan AAA. No hemos encontrado lesiones a nivel de la aorta descendente, abdominal o torácico, en ratones controles de tipo silvestre, ni a tiempos cortos de exposición a Ang-II (1-7 días) ni a más largos (28 días). Estos datos ponen de manifiesto la importancia *Rcan1* en el mantenimiento de la homeostasis del vaso y su papel en la aparición de los HIMs inducidos por Ang-II. En este sentido, es importante destacar que, a pesar de que ya existían estudios que mostraban formación de aneurismas en la AoAsc de ratones silvestres en respuesta a Ang-II<sup>201</sup>, el modelo de formación de AAA en ratón está típicamente ligado a animales hiperlipidémicos: deficientes en la Apolipoproteína E (*ApoE*<sup>-/-</sup>)<sup>202,203</sup>. Por esto, resulta tan sorprendente la evolución de estos ratones deficientes en *Rcan1* hacia la formación de AAA teniendo un genotipo *ApoE*<sup>+/+</sup>. Así, la delección inducible de *Rcan1* puede proporcionar un importante modelo animal para el estudio de la patología de formación de HIM, y para potencialmente trasladar los avances encontrados a pacientes humanos.

### Fenotipos causados por la delección inducible *versus* la delección constitutiva de *Rcan1*

Trabajos previos a este que presentamos habían abordado el papel de *Rcan1* en el contexto de la remodelación vascular. En contraste con los resultados aquí presentados, *Rcan1* fue descrito inicialmente por nuestro grupo como un mediador del daño vascular, dado que su ausencia confería un efecto protector frente al desarrollo de enfermedades cardiovasculares

como las relacionadas con formación de neointima, el desarrollo de AAA y la formación de aterosclerosis<sup>82,155</sup>. Sin embargo, estos estudios fueron llevados a cabo utilizando ratones *knockout convencionales* para *Rcan1*, donde su expresión estaba eliminada de forma constitutiva desde el desarrollo<sup>160,161</sup> (aquí referidos como ratones “constitutivos” o *Rcan1*<sup>-/-</sup>). En el presente estudio, hemos generado y descrito por primera vez modelos animales modificados genéticamente para la delección de *Rcan1* de forma inducible y específica de determinados tipos celulares (sistema Cre<sup>ERT2</sup>/loxP). Además, hemos desarrollado todos los experimentos en paralelo con los ratones con deficiencia constitutiva de *Rcan1*, encontrando sorprendentes diferencias en el comportamiento de ambos modelos animales. Aunque la delección inducible de *Rcan1* causa un fenotipo de sensibilidad a la hipertensión y con tendencia a la formación de HIMs, los ratones *Rcan1*<sup>-/-</sup> se comportaron de forma similar a los ratones control de tipo silvestre. Si bien los animales *Rcan1*<sup>-/-</sup> presentaron algunas lesiones en la aorta tras 7 días de infusión con Ang-II, dichas lesiones fueron menos frecuentes y más leves que en el modelo inducible. Además, los ratones constitutivos *Rcan1*<sup>-/-</sup> estudiados nunca presentaron DAs letales o formación de AAA en respuesta a Ang-II, que sí tuvo lugar en los ratones inducibles. Una posible explicación a este comportamiento tan diferente es que en el caso del ratón *Rcan1*<sup>-/-</sup> constitutivo se produzcan mecanismos compensatorios por los que la ausencia de *Rcan1* modifique la expresión de otros genes que suplan esta carencia durante el desarrollo embrionario y fases neonatales. No se encontraron anomalías anatómicas ni estructurales al analizar las aortas de los ratones *Rcan1*<sup>-/-</sup> mediante TEM, que de hecho presentaban una ultraestructura de la pared vascular similar a las aortas de ratones *Rcan1*<sup>+/+</sup>. Además, las aortas de los ratones *Rcan1*<sup>-/-</sup> no mostraron activación de MLC, que sí observamos claramente en las aortas de animales *SM-Rcan1*<sup>-/-</sup> y *EC-Rcan1*<sup>-/-</sup>. Teniendo en consideración las diferencias entre estos modelos animales, estos resultados recomiendan gran precaución y cautela a la hora de adscribir funciones a los genes en base al fenotipo que originan en ratones deficientes, ya que la deficiencia constitutiva o inducible de un gen puede rendir resultados diferentes, incluso contrarios, sobre la función de un gen determinado. Es importante tener presente las posibles diferencias entre modelos constitutivos e inducible, y escoger la aproximación más apropiada. En este caso, consideramos que el fenotipo de los ratones generados para la delección de *Rcan1* de forma condicional e inducible sería el que refleja el papel de *Rcan1* en el remodelado vascular, y que los posibles efectos compensatorios que en su ausencia se producirían durante el desarrollo embrionario, serían los responsables del comportamiento diferente de los ratones *Rcan1*<sup>-/-</sup>.

## Redundancia funcional de Rcan1-1 y Rcan1-4 de origen endotelial y de músculo liso en procesos de remodelado vascular

Hasta ahora, los estudios sobre la función de Rcan1 en diferentes contextos fisiológicos y patológicos se han basado en la utilización de los ratones *knockout* constitutivos, donde la expresión de ambas isoformas de Rcan1 está bloqueada<sup>160</sup>. Otros estudios se han basado en la sobre-expresión de Rcan1-1 o Rcan1-4 mediante sistemas que no reflejan las condiciones de expresión fisiológica<sup>128,133</sup>. En este trabajo, hemos generado y mostrado por primera vez un modelo que permite el estudio de la contribución relativa de cada isoforma *in vivo*. Este análisis ha demostrado que, en los modelos de patología vascular analizados no hay diferencias de función entre isoformas; o en otras palabras, no hemos encontrado una función específica de isoforma. Concretamente, la ausencia de Rcan1-1 o Rcan1-4 por separado, bien en el músculo liso o en el endotelio, muestra efectos similares, ya que en ambos casos se producen HIMs en respuesta a Ang-II. Cabe mencionar que tanto la incidencia como la severidad de estos HIMs fue ligeramente superior cuando se eliminó Rcan1-1 que cuando se eliminó Rcan1-4, independientemente de que se hiciese en endotelio o en músculo liso. Sin embargo, estos aumentos no llegaron a ser estadísticamente significativos y siempre fueron menores que los que produjo la ausencia conjunta de las dos isoformas. Un efecto similar se observó con el modelo de ligación de carótida, donde la ausencia independiente de cada isoforma tendía a otorgar un efecto protector de la formación de neointima, siendo así mismo la ausencia de Rcan1-1 más protectora que la de Rcan1-4. Esta protección, que tampoco fue estadísticamente significativa con la delección de solo una isoforma, si lo fue y tuvo mayor magnitud cuando se eliminaron las dos isoformas conjuntamente. El hecho de que la eliminación de Rcan1-1 o la de Rcan1-4 de lugar a un fenotipo similar, sugiere que las isoformas tienen funciones redundantes. Además, tampoco encontramos un comportamiento diferencial cuando estudiamos la delección de las isoformas en el compartimento endotelial o en el de las células de músculo liso, lo que sugiere que además de redundante, la función de las isoformas no es dependiente o selectiva de estos tipos celulares.

Considerando estos datos en su conjunto, podemos concluir que el efecto de la supresión inducible de las isoformas de Rcan1 por separado es similar entre ellas, y que su eliminación simultánea produce un efecto aditivo en la severidad el fenotipo vascular. No descartamos que puedan existir mecanismos compensatorios, y que la ausencia de una isoforma sea compensada con un aumento en la expresión de la otra. Este efecto compensatorio no se aprecia en los modelos patológicos estudiados, donde la ausencia de cada isoforma por separado da lugar a un fenotipo intermedio comparado con la ausencia de ambas isoformas a la vez. Otro aspecto a considerar es la posible interacción entre las isoformas Rcan1-1 y Rcan1-4. En casos puntuales

hemos observado que la ausencia de Rcan1-1 parece afectar positivamente a la expresión de la isoforma Rcan1-4 (Figura 18c). No obstante, los experimentos realizados no nos permiten concluir si este aumento de expresión de Rcan1-4 es debido a una compensación por ausencia de Rcan1-1, o por posibles interferencias de la construcción genética introducida en el gen de *Rcan1*, como por ejemplo que algún *enhancer* o región reguladora se haya visto moderadamente afectada. En el caso de la delección de Rcan1-4, no hemos detectado cambios en la expresión de Rcan1-1. En cualquier caso, en esta tesis no presentamos suficientes datos como para valorar la existencia de mecanismos reguladores de expresión entre isoformas. Además, no hemos detectado compensaciones a nivel de fenotipo en ausencia de Rcan1-1 o Rcan1-4, lo que sugiere que la posible regulación de la expresión no tendría efectos funcionales.

### **La delección inducible y específica de tejido de *Rcan1* presenta un gran potencial para su uso en otros contextos patológicos**

Aunque hemos presentado aquí un modelo de estudio de Rcan1 en el contexto vascular, estos ratones condicionales podrían ser utilizados en cualquier compartimento celular, siempre y cuando se disponga del ratón que exprese la recombinasa Cre controlada con un promotor de interés y condicional de tejido. Por lo tanto, estos animales podrían servir como una potente herramienta para el estudio de Rcan1 en otros órganos y enfermedades. Rcan1 es una proteína importante que ha sido estudiada en más detalle en tejidos como sistema nervioso, el cerebro o el sistema inmunológico<sup>129,145,204-206</sup>. Existen evidencias sobre una posible función de Rcan1 en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y el Parkinson<sup>127,130</sup>. Sin embargo, al mismo tiempo también hay muchas evidencias sobre un papel de Rcan1 durante el desarrollo del cerebro<sup>112,161</sup>. El uso de modelos *knockout* constitutivos, en los que la ausencia de una proteína pueda influir en la regulación o función de otras proteínas o genes durante el desarrollo embrionario, podría impedir o incluso sesgar los resultados obtenidos en edad adulta. Los modelos de ratón condicional e inducible para Rcan1 y sus isoformas que hemos diseñado podrían ser la clave para resolver muchos de los problemas que se plantean en este sentido.

### **La formación de los HIMs es causada por un aumento de la PA**

Los HIMs están, por lo general, estrechamente asociados con la edad y la hipertensión. La mayoría de los pacientes diagnosticados con HIM tienen más de 60 años de edad y presentan valores altos de PA en el momento del diagnóstico<sup>53,57</sup>. De hecho, el tratamiento principal de pacientes con HIM, cuando no se trata de una emergencia quirúrgica, consiste en controlar los

niveles de PA con fármacos bloqueantes de los receptores  $\beta$  adrenérgicos en combinación con otros vasodilatadores<sup>57,63</sup>.

En lo que a Ang-II se refiere, los efectos a nivel vascular y sistémico pueden ser muy amplios, y no restringirse únicamente al aumento de la PA, ya que se ha demostrado que Ang-II también participa en procesos de remodelado vascular, incluyendo hipertrofia, inflamación y fibrosis<sup>207-209</sup>. Estudios previos han mostrado que la prevención de la hipertensión inducida por Ang-II con Amlo, un fármaco alternativo para el tratamiento de la hipertensión, protege de la formación de AAA en ratones hipercolesterolémicos<sup>210,211</sup>.

Nuestros estudios han demostrado que la prevención del aumento de la PA inducida por Ang-II mediante tratamiento con Amlo, previene la mortalidad y disminuye la incidencia de HIM. En un abordaje complementario, en el cual se indujo un aumento de la PA con agentes diferentes a Ang-II (L-NAME), los ratones *SM-Rcan1*<sup>-/-</sup> desarrollaron lesiones aórticas fenotípicamente similares a los HIM inducidos por Ang-II. Estas lesiones promovidas por L-NAME presentaban menor incidencia y severidad (menor área afectada por el HIM), en comparación a las lesiones provocadas por Ang-II. De la misma manera, los niveles de PA alcanzados por el tratamiento con Ang-II son superiores, rondando los 160mmHg de PA sistólica, frente a un promedio de 140mmHg en los grupos de ratones tratados con L-NAME. Esta diferencia en los valores de PA con cada tratamiento podría explicar la diferencia en la severidad observada en las lesiones.

El tratamiento con L-NAME induce hipertensión por inhibición de la síntesis de NO y, por tanto, por inhibición de la relajación vascular. Si bien es cierto que este mecanismo es independiente de Ang-II, no podemos descartar que el aumento de la PA sistémica active eventualmente al sistema Renina-Angiotensina. La PA es regulada a nivel sistémico y, por lo tanto, cabe suponer que el sistema Renina-Angiotensina endógeno pudiera involucrarse en la regulación a medio-largo plazo. En este sentido, nuestros tratamientos se han realizado durante periodos relativamente cortos (7 días) y por ello creemos que las lesiones encontradas son producto de la hipertensión generada por L-NAME. Además, una hipótesis sería que una activación de la Ang-II endógena no alcanzase niveles comparables con la administración exógena de Ang-II o de L-NAME, quedando ese posible efecto endógeno enmascarado.

La formación de HIMs en ratones *SM-Rcan1*<sup>-/-</sup> tratados tanto con L-NAME como con Ang-II, sugiere que la hipertensión juega un papel importante en la generación de los HIMs. Estos datos sugieren que la estructura de la pared vascular en ratones *SM-Rcan1*<sup>-/-</sup> podría estar dañada previamente a la administración de Ang-II y que el aumento de la PA dispararía las manifestaciones patológicas de forma aguda. Según esta hipótesis, las arterias de ratones con delección inducida de *Rcan1* presentarían una alteración de la homeostasis de la pared vascular

y serían más sensibles a la hipertensión. En este sentido, cabe destacar que los individuos con Síndrome de Down, que presentan una trisomía en la región cromosómica donde se encuentra el gen de *RCAN1*, tienen unos niveles de PA significativamente más bajos que la población general<sup>212-214</sup>. Estos datos sugieren que *RCAN1* podría actuar como regulador negativo del aumento de la PA. Sin embargo, nosotros no hemos podido detectar cambios en los niveles de PA en nuestros ratones deficientes en *Rcan1*, tanto en condiciones basales como tras 28 días de tratamiento con Ang-II. Es posible que, en caso de la existencia de un mecanismo de regulación de la PA, no lo hayamos detectado porque requiera más tiempo. Otra posible explicación es que *RCAN1* no regule la PA directamente, sino que más bien juegue un papel en la respuesta de las arterias a los cambios de PA, como hemos visto en nuestro modelo animal. Así, los pacientes con Síndrome de Down y mayor expresión de *RCAN1* presentarían cierta resistencia al desarrollo de enfermedades vasculares ligadas a la hipertensión. Ciertamente existen estudios que reportan una disminución en la formación de placas de ateroma en pacientes con Síndrome de Down<sup>215-217</sup>, pero no hay estudios sobre la incidencia de HIM, DA o aneurisma en estos pacientes. En cambio, los estudios anteriores con ratones *Rcan1*<sup>-/-</sup> mostraban una disminución del desarrollo de aterosclerosis<sup>155</sup>. Sin embargo, y a la vista del comportamiento diferencial entre los modelos constitutivo e inducible de ausencia de *Rcan1*, no descartamos que los resultados de estos experimentos de aterosclerosis estén sujetos a los posibles efectos compensatorios de la delección de *Rcan1* en el desarrollo. Por ello, sería interesante estudiar si la delección inducible de *Rcan1* produce una exacerbación de las lesiones ateroscleróticas, lo que también reforzaría la hipótesis del papel de *Rcan1* como regulador de la homeostasis del vaso y su respuesta a la hipertensión.

### **Los HIMs se forman en un estadio incipiente tras 6 horas de tratamiento con Ang-II**

Uno de los principales problemas para el estudio de los HIMs es que no se dispone de muchos datos sobre los mecanismos moleculares que median las etapas iniciales de la enfermedad, debido a la dificultad de obtención de muestras en estos estadios. Se han realizado estudios para la obtención de perfiles de expresión génica comparando material aórtico procedente de pacientes con síndrome aórtico agudo (HIM o DA) y muestras procedentes de donantes sanos. Mediante estos datos, se ha tratado de identificar genes regulados diferencialmente en las aortas patológicas como mediadores potenciales de la enfermedad<sup>218-221</sup>. Curiosamente, algunos de los genes más diferencialmente expresados estaban relacionados con el citoesqueleto y desempeñan funciones tales como la motilidad, la adherencia y la producción de la matriz extracelular, entre otros. Sin embargo, estos datos provenían de pacientes donde la enfermedad ya estaba establecida.

Con el objetivo de estudiar los estadios iniciales en la formación de los HIMs, realizamos experimentos de estimulación con Ang-II durante un corto tiempo en nuestros ratones inducibles *SM-Rcan1<sup>-/-</sup>* y *EC-Rcan1<sup>-/-</sup>*. Los animales *SM-Rcan1<sup>-/-</sup>* y *EC-Rcan1<sup>-/-</sup>* desarrollaron lesiones incipientes tras sólo 6 horas de tratamiento con Ang-II. Este dato, junto con el papel de la hipertensión en la generación de las hemorragias, sugiere que la pared vascular de la arteria estaba comprometida con antelación al tratamiento con Ang-II, como consecuencia de la delección de *Rcan1*. De esta manera, la ausencia de *Rcan1*, ya sea en el endotelio o en el músculo liso, estaría afectando a la homeostasis de la pared aórtica, hasta tal punto que la pared arterial no responde normalmente al aumento de la PA. Así, aunque el vaso esté comprometido estructuralmente, un estímulo adicional como la hipertensión es necesario para la manifestación de los signos clínicos de la patología como es el desarrollo del HIM y DA.

El inicio de la enfermedad tras tiempos cortos de tratamiento con Ang-II correlacionó con el aumento de la permeabilidad en los ratones *SM-Rcan1<sup>-/-</sup>* y *EC-Rcan1<sup>-/-</sup>* que ya pudimos evidenciar tras solo de 6 horas de tratamiento. No se detectó permeabilidad vascular en aortas en ausencia de Ang-II, ni en los animales *knockout* ni en los ratones *Rcan1<sup>+/+</sup>*. Estos resultados apoyan la idea de que, aunque la homeostasis de la pared arterial esté afectada en ausencia de *Rcan1*, es necesario un estímulo hipertensivo para desencadenar las hemorragias en la pared de la aorta.

En resumen, este modelo de HIM nos permite controlar, mediante la administración de un estímulo hipertensivo, el tiempo de comienzo de la patología en su fase aguda. Existen otros modelos animales que desarrollan HIMs, como la deficiencia en músculo liso de los receptores de TGF- $\beta$  tipo I o tipo II, donde la delección inducida en edad adulta de estos genes promueve la formación de hemorragias en la aorta. En este modelo, que se desarrollan en ausencia de Ang-II, los HIMs se localizan preferentemente en la AoAsc, y en pocos casos aparecen en la AoTor o AoAbd<sup>78,222</sup>. No obstante, estos trabajos no muestran datos sobre la evolución temporal de los HIMs y los animales no parecen presentar muerte por DA ni desarrollo de AAA a largo plazo. Por ello, nuestro modelo de delección inducible de *Rcan1* y aumento de la PA constituye un excelente modelo para estudiar la patología en sus diferentes fases, y concretamente los estadios previos y tempranos, a día de hoy más desconocidos.

## Origen de la sangre en el modelo de HIM de ratones deficientes en *Rcan1*

Un tema controvertido sobre la formación de los HIMs es la procedencia de la sangre contenida en la lámina media. Hay dos principales hipótesis que intentan contestar a la pregunta: ¿de dónde viene la sangre? Por un lado, algunos estudios apoyan la idea de la existencia de

rupturas en el endotelio aórtico que permitiría la entrada del flujo sanguíneo desde el lumen hasta llegar a la lámina media. Algunos estudios previos han mostrado imágenes señalando lo que parecen desgarros de la íntima en pacientes con HIM, lo que sugiere la rotura del endotelio como origen de la hemorragia<sup>60,64,199,223</sup>. Sin embargo, con estos datos no es posible concluir si la ruptura endotelial se produjo antes o después de la formación del HIM, ya que la evolución de los HIMs puede llevar a una DA, con la consiguiente rotura endotelial. Por otro lado, la segunda hipótesis señala al *vasa vasorum* como responsable de la acumulación de sangre en la pared arterial. Una ruptura del *vasa vasorum* de la aorta facilitaría la salida de sangre entre las capas de la lámina media, sin verse afectado el endotelio aórtico<sup>4,56,57,62</sup>. Los investigadores que apoyan esta postura argumentan a favor de la integridad endotelial en pacientes con HIM.

En este trabajo hemos estudiado la formación del HIM en los pasos previos e iniciales a la aparición de la patología. Los HIMs incipientes formados después de 6 horas de tratamiento con Ang-II fueron detectados en regiones cercanas a la capa adventicia en todos los casos. Por el contrario, no se detectaron disrupciones del endotelio, como tampoco formación de HIMs incipientes en capas cercanas a la lámina íntima. Asimismo, nuestros ensayos de permeabilidad realizados con dextranos marcados con fluorescencia mostraban la acumulación de la señal de fluorescencia en las capas más externas de la lámina media, es decir en las más cercanas a la adventicia. En conjunto, todos los datos obtenidos parecen indicar que, en nuestro modelo de deleción de *Rcan1* en aorta, la sangre procedería de vasos perivasculares. No hemos encontrado presencia de *vasa vasorum* en el interior de la túnica media en los ratones estudiados. Esta es una cuestión controvertida, ya que no hay evidencias en la bibliografía consistentes sobre la existencia de *vasa vasorum* en ratones en condiciones fisiológicas. Algunas publicaciones han mostrado la presencia de *vasa vasorum* en aortas de ratón en modelos de aterosclerosis y aneurismas<sup>224-227</sup>. Una posible explicación podría ser que el tratamiento con Ang-II estimula la formación de *vasa vasorum* en aortas, que participasen en la formación de los HIMs, aunque esta hipótesis es improbable en tiempos tan cortos como son las 6 horas de tratamiento. Otra posibilidad es que los pequeños vasos perivasculares, incluidas las arteriolas y los capilares pequeños que se encuentran alrededor de la aorta, en la adventicia, respondan a la hipertensión inducida por Ang-II y se rompan, explicando el aumento de la permeabilidad en esta región. Este hecho, junto con la desregulación de la homeostasis de la capa media, explicaría la presencia de sangre en la pared vascular aórtica. En conclusión, nuestros datos apoyan un origen externo del sangrado, procedente de pequeños vasos, ya sean *vasa vasorum* no detectado o arteriolas perivasculares.

## Los HIMs se forman en la aorta y no se detectan en otros vasos u otros tejidos estudiados

Habiendo considerado la relevancia que podrían tener los vasos más pequeños en la formación del HIM, nos hemos planteado la posibilidad de formación de hemorragias en otros órganos. Para ello, hemos analizado diversos tejidos en los ratones inducibles *SM-Rcan1<sup>-/-</sup>* y *EC-Rcan1<sup>-/-</sup>*, incluyendo los pulmones, los riñones y el cerebro, tanto en ausencia como en presencia de Ang-II. En ningún caso detectamos presencia de hemorragias o de otras anomalías de cualquier tipo. En relación a esta exclusividad de la aorta como nicho de los HIMs, una posibilidad es que, aunque es probable que el origen de la sangre sean los vasos más pequeños, es realmente el remodelado de la estructura de la pared aórtica lo que permite al flujo sanguíneo traspasar y quedar retenido en su lámina media. Según esta hipótesis, es razonable aceptar una tendencia a aumentar la permeabilidad en otros tejidos como los pulmones y los riñones en ausencia de *Rcan1*, a pesar de que no se detecten hemorragias en estos tejidos. Otra explicación, que no sería incompatible con la hipótesis anterior, es que las condiciones de hipertensión afecten en mayor grado a las arterias más grandes y más cercanas al corazón. En este sentido, la aorta es la arteria más grande del cuerpo y recibe la sangre directamente del corazón, lo que explicaría que sea el vaso afectado principalmente.

Por otro lado, el promotor *Myh11* se ha mostrado activo no sólo en las CMLVs, sino también en otros tipos de músculo liso no vascular<sup>167</sup>. Estudiamos, en el caso concreto de los ratones *SM-Rcan1<sup>-/-</sup>*, posibles fenotipos en órganos con alto contenido de músculo liso como el esófago o la vejiga. Sorprendentemente, la delección de *Rcan1* en músculo liso parecía comprometer la contracción del músculo liso en el aparato reproductivo de machos *SM-Rcan1<sup>-/-</sup>* en estado basal. Estudios previos han demostrado que la correcta contracción del cuello de la vejiga es necesario para evitar una eyaculación retrógrada<sup>197,198</sup>. Además, a lo largo de la uretra también existe músculo liso que facilita el impulso eyaculador<sup>197</sup>. En el caso de nuestro modelo animal, es posible que la ausencia de *Rcan1* comprometa la contractilidad del músculo liso en la vejiga y la uretra, provocando la retención y coagulación del eyaculado en la uretra. Además, las vesículas de coagulación parecen presentar cierta hipertrofia en las paredes, al mismo tiempo que una reducción del contenido de líquido de coagulación en su interior. Este hallazgo sugiere que las vesículas no retienen el contenido en su interior sino que lo expulsan, contribuyendo a la formación de coágulo a lo largo de la uretra. Al estudiar marcadores de contractilidad de músculo liso, encontramos variabilidad en el estado de fosforilación de la MLC, que en algunos casos parece estar activada. Aunque no podemos concluir que un compromiso de la capacidad contráctil sea el único responsable, todos los datos indican que puede existir cierta relación entre *Rcan1* y p-MLC y la disfunción eyaculatoria.

## La ausencia de *Rcan1* genera cambios en la ultraestructura de la pared vascular

Todos los datos discutidos hasta el momento han ido mostrando que la delección inducible de *Rcan1* genera una alteración en la organización de la pared vascular, posiblemente anterior al tratamiento con el agente hipertensivo (Ang-II o L-NAME). Esta hipótesis ha sido verificada mediante el estudio de la ultraestructura de la pared aórtica en animales *SM-Rcan1<sup>-/-</sup>* y *EC-Rcan1<sup>-/-</sup>* mediante MET. Las aortas de ratones *SM-Rcan1<sup>-/-</sup>* y *EC-Rcan1<sup>-/-</sup>* mostraron un incremento de los espacios intercelulares, que en muchos casos parecían estar ocupados por estructuras filamentosas y microfibras, indicando la presencia de componentes de matriz extracelular. La presencia de espacios entre las células podría deberse a la pérdida de adhesiones entre las células y de las CMLVs a las fibras elásticas, lo que podría facilitar la entrada de la sangre. Además, las células de la lámina media presentan un fenotipo que recuerda al de células contraídas, con núcleos arrugados o plegados, fenotipo que concuerda con la activación detectada de la MLC. Teniendo en cuenta todos los resultados de la ultraestructura de la pared vascular, todo parece indicar que *Rcan1* juega un papel imprescindible, tanto en CEs como en CMLVs, en el mantenimiento de la homeostasis de este nicho vascular.

## La activación de Gsk-3 $\beta$ participa en la activación de mediadores del remodelado vascular

Para el estudio de los mecanismos moleculares por los que *Rcan1* participa en la homeostasis de la pared arterial, recurrimos a la bibliografía para estudiar sus principales interactores. En concreto, están bien demostradas y aceptadas las interacciones de *Rcan1* con CN, así como de *Rcan1* con Gsk-3  $\beta$ <sup>99,193,204</sup>. Concretamente, se ha descrito a *Rcan1* como sustrato de Gsk-3  $\beta$ , que lo puede fosforilar en las Ser108 y Ser112<sup>118</sup>. En el presente trabajo, hemos detectado la interacción de *Rcan1* y Gsk-3  $\beta$  en CMLVs en condiciones basales, lo que resalta la importancia de esta interacción para la función fisiológica de las CMLVs. Sin embargo, no había información disponible acerca de efectos de la ausencia de *Rcan1* en la actividad de Gsk-3  $\beta$ . En esta tesis, hemos detectado una reducción en el nivel de  $\beta$ -catenina en extractos de aorta de animales *SM-Rcan1<sup>-/-</sup>* y *EC-Rcan1<sup>-/-</sup>*.  $\beta$ -catenina, sustrato de Gsk-3  $\beta$ , es fosforilada y posteriormente ubiquitinada para su degradación por el proteasoma. En otros sistemas, la fosforilación de  $\beta$ -catenina por Gsk-3  $\beta$  promueve su translocación al núcleo<sup>228</sup>. Así, la actividad de Gsk-3  $\beta$  se traduce tanto en una reducción en los niveles de  $\beta$ -catenina como en su localización nuclear<sup>194</sup>. Es posible que la disminución de expresión o la ausencia de *Rcan1* deje mayor accesibilidad al dominio activo de Gsk-3  $\beta$  para otros sustratos, actuando

como un inhibidor competitivo. Esta hipótesis, que exige validación con experimentos más específicos, podría justificar un mecanismo por el cual la delección de *Rcan1*, aumentaría la actividad de Gsk-3  $\beta$ .

La ruta de señalización de Gsk-3  $\beta$  juega un papel importante en un extenso número de procesos biológicos. Se han descrito un gran número de sustratos de Gsk-3  $\beta$ , entre ellos: además de  $\beta$ -catenina, que desempeña un papel importante en las uniones de adhesión (*adherens junctions*) epiteliales; Tau también es un sustrato bien caracterizado en el sistema nervioso; o NFAT, familia de factores de transcripción inactivados por Gsk-3  $\beta$ . Más recientemente, también se ha demostrado un papel potencialmente activador de Gsk-3  $\beta$  sobre la vía de señalización de RhoA<sup>191,192</sup>. La activación de la quinasa asociada a Rho (Rock) promueve la inducción de p-MLC mediante la inactivación por fosforilación de la fosfatasa Mypt1, la cual defosforila específicamente a p-MLC<sup>229</sup>. Alternativamente, la quinasa de la cadena ligera de miosina (Mlck) puede fosforilar directamente a MLC. Nuestros datos revelan que la inhibición de Rock inhibe la fosforilación de MLC, sugiriendo que es la principal vía de activación en este modelo. De este modo, la deficiencia de *Rcan1* aumenta la actividad de Gsk-3  $\beta$  sobre la quinasa Rock, quien a su vez fosforila a MLC<sup>85</sup> (Figura 36). Está bien aceptado que MLC es un regulador de contracción en el músculo liso, ya que su activación por fosforilación promueve la interacción de la miosina con la actina, permitiendo la contracción<sup>190</sup>. Es posible que una activación exacerbada de MLC genere contracción continuada, alterando la respuesta normal del vaso ante aumentos de PA. La activación de MLC ya había sido previamente vinculada a procesos patológicos como el cáncer y las metástasis<sup>230</sup>. También se le ha atribuido un papel importante en algunas enfermedades cardiovasculares como la formación de aneurismas<sup>36,37,231</sup>.

### **Rcan1 y MLC como dianas terapéuticas y marcadores de sensibilidad a la hipertensión**

En este estudio hemos demostrado que la inducción de p-MLC es un mediador importante en el desarrollo de los HIMs en ratones con delección de *Rcan1*. Otros estudios anteriores ya sugerían un potencial uso de Fasudil para la prevención de patologías vasculares<sup>37,231,232</sup>. Por ejemplo, se ha visto que Fasudil reduce la incidencia de AAA en un modelo de infusión de Ang-II en ratones ApoE<sup>-/-</sup><sup>37</sup> y la formación de aneurismas cerebrales en ratas<sup>231</sup>. Asimismo se ha estudiado el papel terapéutico de Fasudil en la hipertensión pulmonar<sup>232</sup>. En esta tesis, el tratamiento preventivo con el inhibidor de Rock Fasudil inhibió la fosforilación de la cadena ligera de miosina, así como la formación de los HIMs. Estos resultados muestran la importancia de la inducción de p-MLC en el desarrollo de la enfermedad. Del mismo modo, señalan a los inhibidores de la fosforilación de MLC como una alternativa prometedora para

la prevención o tratamiento del SAA. No obstante, al margen de su potencial, en este trabajo únicamente hemos analizado su papel preventivo. Por ello, resultaría oportuno realizar más estudios donde se administre Fasudil u otros inhibidores de la fosforilación de MLC a lesiones ya formadas para testar su papel como tratamiento de la enfermedad.

Por otro lado, este estudio pone de manifiesto el riesgo al que el sistema vascular se ve sometido en condiciones de alta PA. Aunque la hipertensión es un factor de riesgo establecido, nuestros resultados muestran que es el desencadenante final de los signos clínicos de la enfermedad en este modelo. Esto sugiere que, al margen de la predisposición genética a sufrir problemas vasculares (como por ejemplo aquí, la reducción de los niveles de *Rcan1*), el SAA se puede evitar o retrasar si se mantienen condiciones de PA estables y fisiológicas. Así, la prevención consistiría inicialmente en evitar la hipertensión, especialmente en pacientes de mayor edad. Por otro lado, *Rcan1* se presenta como un posible marcador de respuesta exacerbada ante condiciones de hipertensión. Como ya se ha mencionado, los pacientes de Síndrome de Down muestran, respecto a la población general, un aumento de la expresión de *RCAN1*, niveles reducidos de PA<sup>213,214</sup> y protección frente al desarrollo de aterosclerosis<sup>215-217</sup>. En este sentido, sería interesante analizar muestras humanas en busca de potenciales mutaciones en el gen *RCAN1* que alteren sus niveles de expresión o funcionalidad. La identificación de mutaciones y el seguimiento en el tiempo de estos pacientes podría ayudar a comprender la respuesta a la hipertensión y así comprobar si, efectivamente, alteraciones en niveles de *RCAN1* conducen a respuestas exacerbadas a la hipertensión arterial. Esto podría convertir a *RCAN1* en un excelente marcador de riesgo vascular.

### **La delección inducida de *Rcan1*, al igual que la constitutiva, protege de la formación de neointima**

Uno de los principales objetivos en esta tesis era estudiar la contribución de las distintas isoformas de *Rcan1*, en los diferentes compartimentos celulares, en el remodelado vascular patológico. La ligación de carótida fue propuesta como modelo de remodelado vascular mecánico, ya que la ligación da lugar a cambios hemodinámicos que conducen a la formación de la neointima y posible obstrucción del lumen<sup>76,233</sup>. En contraposición, propusimos el modelo de infusión de Ang-II previamente discutido como modelo de hipertensión farmacológica. Los estudios anteriores que emplearon ratones *knockout* constitutivos investigaron tanto modelos de formación de neointima como de desarrollo de AAA, con resultados similares: la ausencia de *Rcan1* protegía del remodelado vascular patológico en ambos casos<sup>82</sup>. Considerando el fenotipo que muestran los ratones *SM-Rcan1<sup>-/-</sup>*, *EC-Rcan1<sup>-/-</sup>* y *Ubc-Rcan1<sup>-/-</sup>* en el modelo de HIM, cabría esperar un remodelado exacerbado por parte de estos ratones en el modelo de formación

de neoíntima por ligación de carótida. De manera sorprendente, hemos observado como la ausencia inducible de Rcan1 en endotelio y músculo liso, lejos de exacerbar la formación de neoíntima, reduce el progreso de la enfermedad. Igualmente sorprendente, aunque corroborando datos anteriores, es el comportamiento similar de ratones *Rcan1*<sup>-/-</sup> constitutivos frente a inducidos en este modelo. Estos resultados ponen de manifiesto que el mecanismo responsable de la protección frente a la formación de neoíntima, dependiente de Rcan1, ha de ser necesariamente diferente al mecanismo molecular estudiado en los HIM.

La formación de neoíntima es un proceso donde células con fenotipo de miofibroblasto contribuyen, mediante proliferación y posible migración, a la oclusión del vaso<sup>233</sup>. La activación de la migración y la proliferación conduce al crecimiento de esa “nueva íntima”, que continúa creciendo hasta obstruir el lumen. Si consideramos este proceso simplificado, es posible que el fenotipo contráctil por activación de MLC encontrado en las túnica media de aortas de animales *SM-Rcan1*<sup>-/-</sup> y *EC-Rcan1*<sup>-/-</sup> impida o dificulte la conversión al estado migratorio y proliferativo, aquí patológico. Sin embargo, esta hipótesis que podría encajar y explicar los datos obtenidos, se encuentra enfrentada con el hecho de que los ratones con delección inducible se comportan de manera diferente en modelos de HIM y de ligación de carótida. Por lo tanto, aunque es una hipótesis atractiva, no resulta suficientemente convincente como explicación definitiva.

De manera más acorde con los datos previos de HIM, hemos comprobado que la ausencia de las isoformas por separado presenta un efecto similar y aditivo cuando se eliminan ambas a la vez. De forma similar a lo observado con la formación de HIM, la ausencia de Rcan1-1, parece presentar un efecto mayor (mayor protección en el caso de la formación de neoíntima) que la ausencia de Rcan1-4. Sin embargo, estas pequeñas diferencias no resultan significativas según los análisis estadísticos.

Por último, es importante resaltar que los experimentos de ligación de carótida, propuestos como un modelo de daño mecánico, están realizados en presencia de bajas dosis de Ang-II. Mediante experimentos piloto preliminares observamos que, en ausencia de estímulo, la formación de neoíntima era muy pequeña, y por lo tanto los cambios observados más difíciles de analizar. Por ello, quisimos aumentar la severidad del proceso estimulando con una dosis baja de Ang-II. Aquí cabe destacar que la dosis de Ang-II (0,5µg/g/min) no consiguió modificar la PA como tampoco generar lesiones aórticas de ningún tipo ni efectos letales. Por lo tanto, aunque el efecto fundamental del modelo sean los cambios hemodinámicos, no podemos atribuirle un papel únicamente mecánico.

## Comunicación endotelio-músculo liso en la aorta

Uno de los resultados más intrigantes de los encontrados en este trabajo es la similitud de los fenotipos cuando se elimina *Rcan1* en el músculo liso o en el endotelio. Aunque ambos compartimentos celulares son elementos importantes de la pared vascular, sus funciones y propiedades son sustancialmente diferentes. No obstante, ambos tipos celulares comparten nicho y, por lo tanto, están en constante interacción. Existen muchas evidencias de los diferentes medios de comunicación entre las CEs y las CMLVs en la pared arterial. En primer lugar, ambos tipos celulares liberan gran variedad de moléculas al medio extracelular (citoquinas, factores de crecimiento, iones, etc.), que son detectadas y recibidas por las células circundantes<sup>22,27</sup>. De forma similar, está ampliamente demostrado que tanto las CEs como las CMLVs pueden liberar exosomas y vesículas cargadas con un amplio abanico de moléculas, así como ARNs y otros factores metabólicos, que pueden ser a su vez absorbidos por otras células<sup>13,234,235</sup>. Curiosamente, algunos estudios han atribuido a *Rcan1* un papel importante en la formación y liberación de vesículas<sup>157,158</sup>, un dato que propone una nueva línea de investigación para *Rcan1* en el sistema vascular. Por último, existen conexiones físicas entre CEs y CMLVs: las uniones mioendoteliales (MEJ)<sup>14,15</sup>. Las MEJ son proyecciones citoplasmáticas de CEs hacia la túnica media, a través de la lámina basal, que contactan con las CMLVs. Las MEJ están formadas por uniones de tipo comunicante o *Gap junctions*, las cuales sufren una regulación citoplasmática importante, involucrando la participación directa de canales transmembrana que permiten la transferencia de señales eléctricas y químicas entre las células. Otros elementos de comunicación, como las moléculas de adhesión celular (CAMs), *adherens junctions* o *tight junctions* pueden estar presentes entre estos dos tipos de células<sup>235</sup>. Aunque no hemos estudiado esta cuestión en los ratones condicionales de *Rcan1*, somos partidarios de la existencia de una comunicación dependiente de *Rcan1* entre CEs-CMLVs. Un claro ejemplo de esta comunicación entre CEs y CMLVs se encuentra en los ratones *EC-Rcan1<sup>-/-</sup>*, que presentan una clara inducción de p-MLC localizada en las CMLVs, aun cuando la delección de *Rcan1* se produce únicamente en el endotelio. Este cruce de información molecular ("*crosstalk*") entre endotelio y músculo liso podría explicar cómo las alteraciones en uno de los compartimentos celulares conducen a alteraciones equivalentes en el otro, surgiendo como posible explicación a la similitud en el fenotipo cuando *Rcan1* es eliminado en el endotelio o músculo liso.

En esta línea, hemos realizado experimentos de transcriptómica para tratar de identificar patrones de expresión similares en aortas deficientes en *Rcan1* en CEs o en CMLVs. Un análisis preliminar de estos experimentos ha revelado datos sorprendentes. Un gran porcentaje de los GDE y comunes entre *SM-Rcan1<sup>-/-</sup>* y *EC-Rcan1<sup>-/-</sup>* responden a funciones del sistema nervioso como transporte de vesículas o de neurotransmisores. Si bien es cierto que algunos de estos

genes son considerados más abundantes en funciones nerviosas por las bases de datos, algunos de ellos no han sido estudiados en la vasculatura. Otras funciones de gran relevancia como la señalización celular, el citoesqueleto y la regulación de factores de transcripción aparecen también diferencialmente reguladas en estos análisis. Aunque estos datos son preliminares y requieren de un profundo estudio, abren la puerta a nuevas vías de investigación sobre la función molecular de *Rcan1* en los vasos sanguíneos.

Por último, aunque nuestros datos evidencian un papel central de *Rcan1* en la pared arterial, otros experimentos complementarios serían útiles para resolver algunos aspectos controvertidos. En primer lugar, los datos aquí presentados dan pie a estudiar el papel de *Rcan1* en el desarrollo embrionario. También resultaría interesante inducir la delección de *Rcan1* por vía alternativas; por ejemplo, podría silenciarse *Rcan1* en la pared vascular mediante la infección con lentivirus y así validar el fenotipo obtenido con los ratones transgénicos para la delección inducible de *Rcan1*. Además, nuestros datos evidencian una comunicación molecular entre CEs y CMLVs mediada por *Rcan1*, pero sería necesario un estudio más en profundidad para comprender los mecanismos moleculares de este *crossstalk*; experimentos de co-cultivos y medios condicionados podrían ayudar a elucidar posibles vías de comunicación entre estas células.



# Conclusiones





En este trabajo se demuestra que *Rcan1* tiene un papel central en el mantenimiento de la homeostasis de la pared vascular, y se estudia por primera vez la contribución específica de sus dos isoformas en el remodelado vascular patológico. De los resultados obtenidos se pueden extraer las siguientes conclusiones principales:

1. La delección inducida de *Rcan1*, bien en músculo liso o en endotelio de ratón, predispone a la rápida formación de HIMs y de DAs letales en respuesta al tratamiento con Ang-II.
2. La formación de HIMs en ratones con delección inducida de *Rcan1* es una respuesta dependiente del aumento de la PA.
3. Los HIMs formados en ratones con delección inducida de *Rcan1* evolucionan hacia la formación de AAA tras tratamientos de 28 días con Ang-II.
4. Los HIMs se forman rápidamente tras la aplicación del estímulo hipertensivo (6 horas) y en paralelo con un aumento en la permeabilidad vascular.
5. En condiciones de ausencia de estímulos hipertensivos, la ultraestructura de la pared arterial de los ratones con delección inducida de *Rcan1* está alterada, observándose aumentos de los espacios extracelulares, sugerentes de pérdida de adhesiones intercelulares y disminución de las uniones entre las CMLVs y las fibras elásticas.
6. Los HIMs promovidos por la delección inducida de *Rcan1* están mediados por la fosforilación de la MLC que es activada por Gsk-3  $\beta$  y Rock.
7. Los ratones modificados genéticamente para la eliminación de *Rcan1* presentan fenotipos diferentes en los modelos de formación de HIMs y AAA si la delección es inducida o constitutiva.
8. Los ratones con delección inducida de *Rcan1* constituyen un nuevo modelo animal de formación de HIMs y de su progresión a AAA de gran potencial para el estudio de la patología humana.
9. Las funciones de *Rcan1*-1 y *Rcan1*-4 son similares en procesos de formación de neointima o de HIMs.
10. Tanto la eliminación inducida de *Rcan1* como la constitutiva protege de la formación de neointima en un modelo murino de ligadura de carótida.



# Conclusions





This thesis demonstrates that *Rcan1* has a major role in the maintenance of the aortic wall homeostasis. Furthermore, we have explored, for the first time, the specific contribution of its isoforms to the pathological vascular wall remodeling. From the results shown herein we draw the following conclusions:

1. Induced *Rcan1* deletion in mice, either in smooth muscle or endothelium, predisposes to the rapid formation of IMH and lethal AD upon Ang-II treatment.
2. Hypertension mediates Ang-II-induced IMH formation in mice with induced *Rcan1* deletion.
3. Ang-II-elicited IMHs progress to AAA in mice with induced *Rcan1* deletion.
4. Incipient IMHs are detected as early as 6h after Ang-II infusion and in parallel with an increase in aortic permeability.
5. In normotensive mice, the induction of *Rcan1* deficiency disrupts the vascular ultrastructure, as shown by the increase of the intercellular space, which suggests loss of smooth muscle cells interactions with elastic fibers.
6. IMHs formed in mice with induced *Rcan1* deletion require MLC phosphorylation, a process that is mediated by Gsk-3  $\beta$  and Rock.
7. Induced and constitutive *Rcan1* genetic inactivation cause opposite effects on aortic phenotype in models of IMH and AAA.
8. Inducible *Rcan1* deletion mice are a new model for the study of IMHs and their progression to AAA, which resembles the human pathology.
9. *Rcan1*-1 and *Rcan1*-4 isoforms play a similar role in the vascular context, and their functions are analogous in IMHs and neointima formation murine models.
10. Both inducible and constitutive *Rcan1* depletion protect from neointima formation in a murine model of carotid ligation.



# Bibliografía





1. Baliga, R.R., Nienaber, C.A., Bossone, E., Oh, J.K., Isselbacher, E.M., Sechtem, U., *et al.* The role of imaging in aortic dissection and related syndromes. *JACC. Cardiovascular imaging* **7**, 406-424 (2014).
2. Langheinrich, A.C., Michniewicz, A., Bohle, R.M. & Ritman, E.L. Vasa vasorum neovascularization and lesion distribution among different vascular beds in ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup> double knockout mice. *Atherosclerosis* **191**, 73-81 (2007).
3. Langheinrich, A.C., Michniewicz, A., Sedding, D.G., Walker, G., Beighley, P.E., Rau, W.S., *et al.* Correlation of vasa vasorum neovascularization and plaque progression in aortas of apolipoprotein E(-/-)/low-density lipoprotein(-/-) double knockout mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **26**, 347-352 (2006).
4. Baikoussis, N.G., Apostolakis, E.E., Papakonstantinou, N.A., Siminelakis, S.N., Arnaoutoglou, H., Papadopoulos, G., *et al.* The implication of vasa vasorum in surgical diseases of the aorta. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery* **40**, 412-417 (2011).
5. Vasculature, A. Abdominal Vasculature. (2010).
6. Liñares, J. Sistema Circulatorio. (2011-2013).
7. Sun, Z. Atherosclerosis and atheroma plaque rupture: normal anatomy of vasa vasorum and their role associated with atherosclerosis. *TheScientificWorldJournal* **2014**, 285058 (2014).
8. Schaper, W. & Ito, W.D. Therapeutic targets in cardiovascular disorders. *Current opinion in biotechnology* **7**, 635-640 (1996).
9. Wolf, C., Cai, W.J., Vosschulte, R., Koltai, S., Mousavipour, D., Scholz, D., *et al.* Vascular remodeling and altered protein expression during growth of coronary collateral arteries. *Journal of molecular and cellular cardiology* **30**, 2291-2305 (1998).
10. Stenmark, K.R., Yeager, M.E., El Kasmi, K.C., Nozik-Grayck, E., Gerasimovskaya, E.V., Li, M., *et al.* The adventitia: essential regulator of vascular wall structure and function. *Annual review of physiology* **75**, 23-47 (2013).
11. Lilly, B. We have contact: endothelial cell-smooth muscle cell interactions. *Physiology* **29**, 234-241 (2014).
12. Rhodin, J.A. The ultrastructure of mammalian arterioles and precapillary sphincters. *Journal of ultrastructure research* **18**, 181-223 (1967).
13. Kurachi, M., Mikuni, M. & Ishizaki, Y. Extracellular Vesicles from Vascular Endothelial Cells Promote Survival, Proliferation and Motility of Oligodendrocyte Precursor Cells. *PloS one* **11**, e0159158 (2016).
14. Heberlein, K.R., Straub, A.C., Best, A.K., Greyson, M.A., Looft-Wilson, R.C., Sharma, P.R., *et al.* Plasminogen activator inhibitor-1 regulates myoendothelial junction formation. *Circulation research* **106**, 1092-1102 (2010).
15. Heberlein, K.R., Straub, A.C. & Isakson, B.E. The myoendothelial junction: breaking through the matrix? *Microcirculation* **16**, 307-322 (2009).
16. Renna, N.F., de Las Heras, N. & Miatello, R.M. Pathophysiology of vascular remodeling in hypertension. *International journal of hypertension* **2013**, 808353 (2013).
17. Ward, M.R., Pasterkamp, G., Yeung, A.C. & Borst, C. Arterial remodeling. Mechanisms and clinical implications. *Circulation* **102**, 1186-1191 (2000).
18. Moltzer, E., Essers, J., van Esch, J.H., Roos-Hesselink, J.W. & Danser, A.H. The role of the renin-angiotensin system in thoracic aortic aneurysms: clinical implications. *Pharmacology & therapeutics* **131**, 50-60 (2011).
19. Haller, H., Lindschau, C., Erdmann, B., Quass, P. & Luft, F.C. Effects of intracellular angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Circulation research* **79**, 765-772 (1996).
20. Ferrario, C.M. & Strawn, W.B. Role of the renin-angiotensin-aldosterone system and proinflammatory mediators in cardiovascular disease. *The American journal of cardiology* **98**, 121-128 (2006).
21. Geisterfer, A.A., Peach, M.J. & Owens, G.K. Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells. *Circulation research* **62**, 749-756 (1988).
22. Greene, E.L., Lu, G., Zhang, D. & Egan, B.M. Signaling events mediating the additive effects of oleic acid and angiotensin II on vascular smooth muscle cell migration. *Hypertension* **37**, 308-312 (2001).
23. Heeneman, S., Cleutjens, J.P., Faber, B.C., Creemers, E.E., van Suylen, R.J., Lutgens, E., *et al.* The dynamic extracellular matrix: intervention strategies during heart failure and atherosclerosis. *The Journal of pathology* **200**, 516-525 (2003).
24. Mugabe, B.E., Yaghini, F.A., Song, C.Y., Buharalioglu, C.K., Waters, C.M. & Malik, K.U. Angiotensin II-induced migration of vascular smooth muscle cells is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase-activated c-Src through spleen tyrosine kinase and epidermal growth factor receptor transactivation. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **332**, 116-124 (2010).
25. Ruiz-Ortega, M., Lorenzo, O., Ruperez, M., Esteban, V., Mezzano, S. & Egido, J. Renin-angiotensin system

- and renal damage: emerging data on angiotensin II as a proinflammatory mediator. *Contributions to nephrology*, 123-137 (2001).
26. Ji, Y., Liu, J., Wang, Z. & Liu, N. Angiotensin II induces inflammatory response partly via toll-like receptor 4-dependent signaling pathway in vascular smooth muscle cells. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* **23**, 265-276 (2009).
  27. Berk, B.C. Vascular smooth muscle growth: autocrine growth mechanisms. *Physiological reviews* **81**, 999-1030 (2001).
  28. Porrello, E.R. & Delbridge, L.M. Cardiomyocyte autophagy is regulated by angiotensin II type 1 and type 2 receptors. *Autophagy* **5**, 1215-1216 (2009).
  29. Burson, J.M., Aguilera, G., Gross, K.W. & Sigmund, C.D. Differential expression of angiotensin receptor 1A and 1B in mouse. *The American journal of physiology* **267**, E260-267 (1994).
  30. Benigni, A., Cassis, P. & Remuzzi, G. Angiotensin II revisited: new roles in inflammation, immunology and aging. *EMBO molecular medicine* **2**, 247-257 (2010).
  31. Ito, M., Oliverio, M.I., Mannon, P.J., Best, C.F., Maeda, N., Smithies, O., *et al.* Regulation of blood pressure by the type 1A angiotensin II receptor gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 3521-3525 (1995).
  32. Schulman, I.H. & Raij, L. The angiotensin II type 2 receptor: what is its clinical significance? *Current hypertension reports* **10**, 188-193 (2008).
  33. Touyz, R.M. Intracellular mechanisms involved in vascular remodelling of resistance arteries in hypertension: role of angiotensin II. *Experimental physiology* **90**, 449-455 (2005).
  34. Marrero, M.B., Schieffer, B., Paxton, W.G., Duff, J.L., Berk, B.C. & Bernstein, K.E. The role of tyrosine phosphorylation in angiotensin II-mediated intracellular signalling. *Cardiovascular research* **30**, 530-536 (1995).
  35. Touyz, R.M. & Schiffrin, E.L. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacological reviews* **52**, 639-672 (2000).
  36. Yamakawa, T., Tanaka, S., Numaguchi, K., Yamakawa, Y., Motley, E.D., Ichihara, S., *et al.* Involvement of Rho-kinase in angiotensin II-induced hypertrophy of rat vascular smooth muscle cells. *Hypertension* **35**, 313-318 (2000).
  37. Wang, Y.X., Martin-McNulty, B., da Cunha, V., Vincelette, J., Lu, X., Feng, Q., *et al.* Fasudil, a Rho-kinase inhibitor, attenuates angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm in apolipoprotein E-deficient mice by inhibiting apoptosis and proteolysis. *Circulation* **111**, 2219-2226 (2005).
  38. Khalil, R.A. in *Regulation of Vascular Smooth Muscle Function* (San Rafael (CA), 2010).
  39. Alexander, R.W., Brock, T.A., Gimbrone, M.A., Jr. & Rittenhouse, S.E. Angiotensin increases inositol trisphosphate and calcium in vascular smooth muscle. *Hypertension* **7**, 447-451 (1985).
  40. Marrero, M.B., Schieffer, B., Paxton, W.G., Schieffer, E. & Bernstein, K.E. Electroporation of pp60c-src antibodies inhibits the angiotensin II activation of phospholipase C-gamma 1 in rat aortic smooth muscle cells. *The Journal of biological chemistry* **270**, 15734-15738 (1995).
  41. Taniyama, Y. & Griendling, K.K. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension* **42**, 1075-1081 (2003).
  42. Hogan, P.G., Chen, L., Nardone, J. & Rao, A. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes & development* **17**, 2205-2232 (2003).
  43. Dahlof, B. Cardiovascular disease risk factors: epidemiology and risk assessment. *The American journal of cardiology* **105**, 3A-9A (2010).
  44. Lloyd-Jones, D., Adams, R.J., Brown, T.M., Carnethon, M., Dai, S., De Simone, G., *et al.* Executive summary: heart disease and stroke statistics--2010 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* **121**, 948-954 (2010).
  45. Lloyd-Jones, D.M. Cardiovascular risk prediction: basic concepts, current status, and future directions. *Circulation* **121**, 1768-1777 (2010).
  46. Heeneman, S., Sluimer, J.C. & Daemen, M.J. Angiotensin-converting enzyme and vascular remodeling. *Circulation research* **101**, 441-454 (2007).
  47. Forte, A., Della Corte, A., De Feo, M., Cerasuolo, F. & Cipollaro, M. Role of myofibroblasts in vascular remodelling: focus on restenosis and aneurysm. *Cardiovascular research* **88**, 395-405 (2010).
  48. Forte, A., Della Corte, A., Grossi, M., Bancone, C., Maiello, C., Galderisi, U., *et al.* Differential expression of proteins related to smooth muscle cells and myofibroblasts in human thoracic aortic aneurysm. *Histology*

- and histopathology* **28**, 795-803 (2013).
49. Pasterkamp, G., de Kleijn, D.P. & Borst, C. Arterial remodeling in atherosclerosis, restenosis and after alteration of blood flow: potential mechanisms and clinical implications. *Cardiovascular research* **45**, 843-852 (2000).
  50. Pasterkamp, G., Galis, Z.S. & de Kleijn, D.P. Expansive arterial remodeling: location, location, location. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **24**, 650-657 (2004).
  51. Dunn, W.R. & Gardiner, S.M. Differential alteration in vascular structure of resistance arteries isolated from the cerebral and mesenteric vascular beds of transgenic [(mRen-2)<sup>27</sup>], hypertensive rats. *Hypertension* **29**, 1140-1147 (1997).
  52. Mulvany, M.J. Structural abnormalities of the resistance vasculature in hypertension. *Journal of vascular research* **40**, 558-560 (2003).
  53. Evangelista, A. Aortic intramural haematoma: remarks and conclusions. *Heart* **90**, 379-380 (2004).
  54. Daily, P.O., Trueblood, H.W., Stinson, E.B., Wuerflein, R.D. & Shumway, N.E. Management of acute aortic dissections. *The Annals of thoracic surgery* **10**, 237-247 (1970).
  55. Braverman, A.C. Acute aortic dissection: clinician update. *Circulation* **122**, 184-188 (2010).
  56. Harris, K.M., Braverman, A.C., Eagle, K.A., Woznicki, E.M., Pyeritz, R.E., Myrmel, T., *et al.* Acute aortic intramural hematoma: an analysis from the International Registry of Acute Aortic Dissection. *Circulation* **126**, S91-96 (2012).
  57. Alomari, I.B., Hamirani, Y.S., Madera, G., Tabe, C., Akhtar, N. & Raizada, V. Aortic intramural hematoma and its complications. *Circulation* **129**, 711-716 (2014).
  58. Students, C. CDEM Curriculum.
  59. Trachet, B., Piersigilli, A., Fraga-Silva, R.A., Aslanidou, L., Sordet-Dessimoz, J., Astolfo, A., *et al.* Ascending Aortic Aneurysm in Angiotensin II-Infused Mice: Formation, Progression, and the Role of Focal Dissections. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **36**, 673-681 (2016).
  60. Song, J.K. Diagnosis of aortic intramural haematoma. *Heart* **90**, 368-371 (2004).
  61. Ferrera, C., Vilacosta, I., Gomez-Polo, J.C., Villanueva-Medina, S., Cabeza, B., Ortega, L., *et al.* Evolution and prognosis of intramural aortic hematoma. Insights from a midterm cohort study. *International journal of cardiology* **249**, 410-413 (2017).
  62. Chao, C.P., Walker, T.G. & Kalva, S.P. Natural history and CT appearances of aortic intramural hematoma. *Radiographics : a review publication of the Radiological Society of North America, Inc* **29**, 791-804 (2009).
  63. Baikoussis, N.G., Apostolakis, E.E., Siminelakis, S.N., Papadopoulos, G.S. & Goudevenos, J. Intramural haematoma of the thoracic aorta: who's to be alerted the cardiologist or the cardiac surgeon? *Journal of cardiothoracic surgery* **4**, 54 (2009).
  64. Mukohara, N. Intramural hematoma - contradiction to the theory of rupture of the vasa vasorum at onset. *Annals of thoracic and cardiovascular surgery : official journal of the Association of Thoracic and Cardiovascular Surgeons of Asia* **20**, 949-950 (2014).
  65. Oller, J., Mendez-Barbero, N., Ruiz, E.J., Villahoz, S., Renard, M., Canelas, L.I., *et al.* Nitric oxide mediates aortic disease in mice deficient in the metalloprotease Adamts1 and in a mouse model of Marfan syndrome. *Nature medicine* **23**, 200-212 (2017).
  66. Brooke, B.S., Habashi, J.P., Judge, D.P., Patel, N., Loey, B. & Dietz, H.C., 3rd. Angiotensin II blockade and aortic-root dilation in Marfan's syndrome. *The New England journal of medicine* **358**, 2787-2795 (2008).
  67. Silverstein, M.D., Pitts, S.R., Chaikof, E.L. & Ballard, D.J. Abdominal aortic aneurysm (AAA): cost-effectiveness of screening, surveillance of intermediate-sized AAA, and management of symptomatic AAA. *Proceedings* **18**, 345-367 (2005).
  68. Guo, D.C., Papke, C.L., He, R. & Milewicz, D.M. Pathogenesis of thoracic and abdominal aortic aneurysms. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1085**, 339-352 (2006).
  69. Daugherty, A. & Cassis, L. Angiotensin II and abdominal aortic aneurysms. *Current hypertension reports* **6**, 442-446 (2004).
  70. Daugherty, A. & Cassis, L.A. Mouse models of abdominal aortic aneurysms. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **24**, 429-434 (2004).
  71. Kanematsu, Y., Kanematsu, M., Kurihara, C., Tsou, T.L., Nuki, Y., Liang, E.I., *et al.* Pharmacologically induced thoracic and abdominal aortic aneurysms in mice. *Hypertension* **55**, 1267-1274 (2010).
  72. Shimizu, K., Libby, P. & Mitchell, R.N. Local cytokine environments drive aneurysm formation in allografted aortas. *Trends in cardiovascular medicine* **15**, 142-148 (2005).
  73. Welt, F.G. & Rogers, C. Inflammation and restenosis in the stent era. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular*

- biology* **22**, 1769-1776 (2002).
74. Mintz, G.S., Popma, J.J., Pichard, A.D., Kent, K.M., Satler, L.F., Wong, C., *et al.* Arterial remodeling after coronary angioplasty: a serial intravascular ultrasound study. *Circulation* **94**, 35-43 (1996).
  75. Heeneman, S., Smits, J.F., Leenders, P.J., Schiffers, P.M. & Daemen, M.J. Effects of angiotensin II on cardiac function and peripheral vascular structure during compensated heart failure in the rat. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **17**, 1985-1994 (1997).
  76. Kumar, A. & Lindner, V. Remodeling with neointima formation in the mouse carotid artery after cessation of blood flow. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **17**, 2238-2244 (1997).
  77. McCormick, M.L., Gavrila, D. & Weintraub, N.L. Role of oxidative stress in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysms. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **27**, 461-469 (2007).
  78. Hu, J.H., Wei, H., Jaffe, M., Airhart, N., Du, L., Angelov, S.N., *et al.* Postnatal Deletion of the Type II Transforming Growth Factor-beta Receptor in Smooth Muscle Cells Causes Severe Aortopathy in Mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **35**, 2647-2656 (2015).
  79. Li, H.X., Han, M., Bernier, M., Zheng, B., Sun, S.G., Su, M., *et al.* Kruppel-like factor 4 promotes differentiation by transforming growth factor-beta receptor-mediated Smad and p38 MAPK signaling in vascular smooth muscle cells. *The Journal of biological chemistry* **285**, 17846-17856 (2010).
  80. Martin-Alonso, M., Garcia-Redondo, A.B., Guo, D., Camafeita, E., Martinez, F., Alfranca, A., *et al.* Deficiency of MMP17/MT4-MMP proteolytic activity predisposes to aortic aneurysm in mice. *Circulation research* **117**, e13-26 (2015).
  81. Zhang, Y., Naggar, J.C., Welzig, C.M., Beasley, D., Moulton, K.S., Park, H.J., *et al.* Simvastatin inhibits angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm formation in apolipoprotein E-knockout mice: possible role of ERK. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **29**, 1764-1771 (2009).
  82. Esteban, V., Mendez-Barbero, N., Jimenez-Borreguero, L.J., Roque, M., Novensa, L., Garcia-Redondo, A.B., *et al.* Regulator of calcineurin 1 mediates pathological vascular wall remodeling. *The Journal of experimental medicine* **208**, 2125-2139 (2011).
  83. Hall, A. Rho family GTPases. *Biochemical Society transactions* **40**, 1378-1382 (2012).
  84. Schwartz, M. Rho signalling at a glance. *Journal of cell science* **117**, 5457-5458 (2004).
  85. Kaneko-Kawano, T., Takasu, F., Naoki, H., Sakumura, Y., Ishii, S., Ueba, T., *et al.* Dynamic regulation of myosin light chain phosphorylation by Rho-kinase. *PloS one* **7**, e39269 (2012).
  86. Olson, M.F., Pasteris, N.G., Gorski, J.L. & Hall, A. Faciogenital dysplasia protein (FGD1) and Vav, two related proteins required for normal embryonic development, are upstream regulators of Rho GTPases. *Current biology : CB* **6**, 1628-1633 (1996).
  87. Pai, S.Y., Kim, C. & Williams, D.A. Rac GTPases in human diseases. *Disease markers* **29**, 177-187 (2010).
  88. Nadif Kasri, N. & Van Aelst, L. Rho-linked genes and neurological disorders. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* **455**, 787-797 (2008).
  89. Zhou, Q., Gensch, C. & Liao, J.K. Rho-associated coiled-coil-forming kinases (ROCKs): potential targets for the treatment of atherosclerosis and vascular disease. *Trends in pharmacological sciences* **32**, 167-173 (2011).
  90. Dasgupta, S.K., Le, A., Vijayan, K.V. & Thiagarajan, P. Dasatinib inhibits actin fiber reorganization and promotes endothelial cell permeability through RhoA-ROCK pathway. *Cancer medicine* **6**, 809-818 (2017).
  91. Okamura, H., Garcia-Rodriguez, C., Martinson, H., Qin, J., Virshup, D.M. & Rao, A. A conserved docking motif for CK1 binding controls the nuclear localization of NFAT1. *Molecular and cellular biology* **24**, 4184-4195 (2004).
  92. Macian, F. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nature reviews. Immunology* **5**, 472-484 (2005).
  93. Alfranca, A., Iniguez, M.A., Fresno, M. & Redondo, J.M. Prostanoid signal transduction and gene expression in the endothelium: role in cardiovascular diseases. *Cardiovascular research* **70**, 446-456 (2006).
  94. Iniguez, M.A., Rodriguez, A., Volpert, O.V., Fresno, M. & Redondo, J.M. Cyclooxygenase-2: a therapeutic target in angiogenesis. *Trends in molecular medicine* **9**, 73-78 (2003).
  95. Minami, T., Horiuchi, K., Miura, M., Abid, M.R., Takabe, W., Noguchi, N., *et al.* Vascular endothelial growth factor- and thrombin-induced termination factor, Down syndrome critical region-1, attenuates endothelial cell proliferation and angiogenesis. *The Journal of biological chemistry* **279**, 50537-50554 (2004).
  96. Yao, Y.G. & Duh, E.J. VEGF selectively induces Down syndrome critical region 1 gene expression in endothelial cells: a mechanism for feedback regulation of angiogenesis? *Biochemical and biophysical research communications* **321**, 648-656 (2004).
  97. Molkentin, J.D., Lu, J.R., Antos, C.L., Markham, B., Richardson, J., Robbins, J., *et al.* A calcineurin-dependent

- transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* **93**, 215-228 (1998).
98. Sun, L., Youn, H.D., Loh, C., Stolow, M., He, W. & Liu, J.O. Cabin 1, a negative regulator for calcineurin signaling in T lymphocytes. *Immunity* **8**, 703-711 (1998).
  99. Martinez-Martinez, S., Genesca, L., Rodriguez, A., Raya, A., Salichs, E., Were, F., *et al.* The RCAN carboxyl end mediates calcineurin docking-dependent inhibition via a site that dictates binding to substrates and regulators. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 6117-6122 (2009).
  100. Dell'Acqua, M.L., Faux, M.C., Thorburn, J., Thorburn, A. & Scott, J.D. Membrane-targeting sequences on AKAP79 bind phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate. *The EMBO journal* **17**, 2246-2260 (1998).
  101. Faux, M.C., Rollins, E.N., Edwards, A.S., Langeberg, L.K., Newton, A.C. & Scott, J.D. Mechanism of A-kinase-anchoring protein 79 (AKAP79) and protein kinase C interaction. *The Biochemical journal* **343 Pt 2**, 443-452 (1999).
  102. Klauck, T.M., Faux, M.C., Labudda, K., Langeberg, L.K., Jaken, S. & Scott, J.D. Coordination of three signaling enzymes by AKAP79, a mammalian scaffold protein. *Science* **271**, 1589-1592 (1996).
  103. Hilioti, Z. & Cunningham, K.W. The RCN family of calcineurin regulators. *Biochemical and biophysical research communications* **311**, 1089-1093 (2003).
  104. Strippoli, P., Petrini, M., Lenzi, L., Carinci, P. & Zannotti, M. The murine DSCR1-like (Down syndrome candidate region 1) gene family: conserved synteny with the human orthologous genes. *Gene* **257**, 223-232 (2000).
  105. Mehta, S., Li, H., Hogan, P.G. & Cunningham, K.W. Domain architecture of the regulators of calcineurin (RCANs) and identification of a divergent RCAN in yeast. *Molecular and cellular biology* **29**, 2777-2793 (2009).
  106. Strippoli, P., Lenzi, L., Petrini, M., Carinci, P. & Zannotti, M. A new gene family including DSCR1 (Down Syndrome Candidate Region 1) and ZAKI-4: characterization from yeast to human and identification of DSCR1-like 2, a novel human member (DSCR1L2). *Genomics* **64**, 252-263 (2000).
  107. Fuentes, J.J., Pritchard, M.A. & Estivill, X. Genomic organization, alternative splicing, and expression patterns of the DSCR1 (Down syndrome candidate region 1) gene. *Genomics* **44**, 358-361 (1997).
  108. Kingsbury, T.J. & Cunningham, K.W. A conserved family of calcineurin regulators. *Genes & development* **14**, 1595-1604 (2000).
  109. Rodriguez, A., Roy, J., Martinez-Martinez, S., Lopez-Maderuelo, M.D., Nino-Moreno, P., Orti, L., *et al.* A conserved docking surface on calcineurin mediates interaction with substrates and immunosuppressants. *Molecular cell* **33**, 616-626 (2009).
  110. Mulero, M.C., Aubareda, A., Orzaez, M., Messeguer, J., Serrano-Candelas, E., Martinez-Hoyer, S., *et al.* Inhibiting the calcineurin-NFAT (nuclear factor of activated T cells) signaling pathway with a regulator of calcineurin-derived peptide without affecting general calcineurin phosphatase activity. *The Journal of biological chemistry* **284**, 9394-9401 (2009).
  111. Davies, K.J., Ermak, G., Rothermel, B.A., Pritchard, M., Heitman, J., Ahnn, J., *et al.* Renaming the DSCR1/Adapt78 gene family as RCAN: regulators of calcineurin. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **21**, 3023-3028 (2007).
  112. Graef, I.A., Wang, F., Charron, F., Chen, L., Neilson, J., Tessier-Lavigne, M., *et al.* Neurotrophins and netrins require calcineurin/NFAT signaling to stimulate outgrowth of embryonic axons. *Cell* **113**, 657-670 (2003).
  113. Mitchell, A.N., Jayakumar, L., Koleilat, I., Qian, J., Sheehan, C., Bhoiwala, D., *et al.* Brain expression of the calcineurin inhibitor RCAN1 (Adapt78). *Archives of biochemistry and biophysics* **467**, 185-192 (2007).
  114. Crawford, D.R., Leahy, K.P., Abramova, N., Lan, L., Wang, Y. & Davies, K.J. Hamster adapt78 mRNA is a Down syndrome critical region homologue that is inducible by oxidative stress. *Archives of biochemistry and biophysics* **342**, 6-12 (1997).
  115. Minami, T. Calcineurin-NFAT activation and DSCR-1 auto-inhibitory loop: how is homeostasis regulated? *Journal of biochemistry* **155**, 217-226 (2014).
  116. Suehiro, J., Kanki, Y., Makihara, C., Schadler, K., Miura, M., Manabe, Y., *et al.* Genome-wide approaches reveal functional vascular endothelial growth factor (VEGF)-inducible nuclear factor of activated T cells (NFAT) c1 binding to angiogenesis-related genes in the endothelium. *The Journal of biological chemistry* **289**, 29044-29059 (2014).
  117. Oh, M., Dey, A., Gerard, R.D., Hill, J.A. & Rothermel, B.A. The CCAAT/enhancer binding protein beta (C/EBPbeta) cooperates with NFAT to control expression of the calcineurin regulatory protein RCAN1-4. *The Journal of biological chemistry* **285**, 16623-16631 (2010).
  118. Hilioti, Z., Gallagher, D.A., Low-Nam, S.T., Ramaswamy, P., Gajer, P., Kingsbury, T.J., *et al.* GSK-3 kinases enhance calcineurin signaling by phosphorylation of RCNs. *Genes & development* **18**, 35-47 (2004).

## Bibliografia

119. Liu, Q., Busby, J.C. & Molkenin, J.D. Interaction between TAK1-TAB1-TAB2 and RCAN1-calcineurin defines a signalling nodal control point. *Nature cell biology* **11**, 154-161 (2009).
120. Abbasi, S., Lee, J.D., Su, B., Chen, X., Alcon, J.L., Yang, J., *et al.* Protein kinase-mediated regulation of calcineurin through the phosphorylation of modulatory calcineurin-interacting protein 1. *The Journal of biological chemistry* **281**, 7717-7726 (2006).
121. Genesca, L., Aubareda, A., Fuentes, J.J., Estivill, X., De La Luna, S. & Perez-Riba, M. Phosphorylation of calcipressin 1 increases its ability to inhibit calcineurin and decreases calcipressin half-life. *The Biochemical journal* **374**, 567-575 (2003).
122. Jung, M.S., Park, J.H., Ryu, Y.S., Choi, S.H., Yoon, S.H., Kwon, M.Y., *et al.* Regulation of RCAN1 protein activity by Dyrk1A protein-mediated phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* **286**, 40401-40412 (2011).
123. Lee, E.J., Seo, S.R., Um, J.W., Park, J., Oh, Y. & Chung, K.C. NF-kappaB-inducing kinase phosphorylates and blocks the degradation of Down syndrome candidate region 1. *The Journal of biological chemistry* **283**, 3392-3400 (2008).
124. Asada, S., Ikeda, A., Nagao, R., Hama, H., Sudo, T., Fukamizu, A., *et al.* Oxidative stress-induced ubiquitination of RCAN1 mediated by SCFbeta-TrCP ubiquitin ligase. *International journal of molecular medicine* **22**, 95-104 (2008).
125. Reeves, R.H., Irving, N.G., Moran, T.H., Wohn, A., Kitt, C., Sisodia, S.S., *et al.* A mouse model for Down syndrome exhibits learning and behaviour deficits. *Nature genetics* **11**, 177-184 (1995).
126. Arron, J.R., Winslow, M.M., Polleri, A., Chang, C.P., Wu, H., Gao, X., *et al.* NFAT dysregulation by increased dosage of DSCR1 and DYRK1A on chromosome 21. *Nature* **441**, 595-600 (2006).
127. Ermak, G. & Davies, K.J. Chronic high levels of the RCAN1-1 protein may promote neurodegeneration and Alzheimer disease. *Free radical biology & medicine* **62**, 47-51 (2013).
128. Ermak, G., Morgan, T.E. & Davies, K.J. Chronic overexpression of the calcineurin inhibitory gene DSCR1 (Adapt78) is associated with Alzheimer's disease. *The Journal of biological chemistry* **276**, 38787-38794 (2001).
129. Ermak, G. & Davies, K.J. DSCR1(Adapt78)--a Janus gene providing stress protection but causing Alzheimer's disease? *IUBMB life* **55**, 29-31 (2003).
130. Ermak, G. & Davies, K.J. Gene expression in Alzheimer's disease. *Drugs of today* **38**, 509-516 (2002).
131. Ermak, G., Pritchard, M.A., Dronjak, S., Niu, B. & Davies, K.J. Do RCAN1 proteins link chronic stress with neurodegeneration? *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **25**, 3306-3311 (2011).
132. Martin, K.R., Corlett, A., Dubach, D., Mustafa, T., Coleman, H.A., Parkington, H.C., *et al.* Over-expression of RCAN1 causes Down syndrome-like hippocampal deficits that alter learning and memory. *Human molecular genetics* **21**, 3025-3041 (2012).
133. Dierssen, M., Arque, G., McDonald, J., Andreu, N., Martinez-Cue, C., Florez, J., *et al.* Behavioral characterization of a mouse model overexpressing DSCR1/ RCAN1. *PloS one* **6**, e17010 (2011).
134. Hoeffler, C.A., Dey, A., Sachan, N., Wong, H., Patterson, R.J., Shelton, J.M., *et al.* The Down syndrome critical region protein RCAN1 regulates long-term potentiation and memory via inhibition of phosphatase signaling. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **27**, 13161-13172 (2007).
135. Hoeffler, C.A. & Klann, E. Switching gears: translational mastery of transcription during memory formation. *Neuron* **54**, 186-189 (2007).
136. Gerlai, R., Williams, S.P., Cairns, B., Van Bruggen, N., Moran, P., Shih, A., *et al.* Protein targeting in the analysis of learning and memory: a potential alternative to gene targeting. *Experimental brain research* **123**, 24-35 (1998).
137. Baek, K.H., Zaslavsky, A., Lynch, R.C., Britt, C., Okada, Y., Siarey, R.J., *et al.* Down's syndrome suppression of tumour growth and the role of the calcineurin inhibitor DSCR1. *Nature* **459**, 1126-1130 (2009).
138. Minami, T., Jiang, S., Schadler, K., Suehiro, J., Osawa, T., Oike, Y., *et al.* The calcineurin-NFAT-angiopoietin-2 signaling axis in lung endothelium is critical for the establishment of lung metastases. *Cell reports* **4**, 709-723 (2013).
139. Iizuka, M., Abe, M., Shiiba, K., Sasaki, I. & Sato, Y. Down syndrome candidate region 1, a downstream target of VEGF, participates in endothelial cell migration and angiogenesis. *Journal of vascular research* **41**, 334-344 (2004).
140. Minami, T., Miura, M., Aird, W.C. & Kodama, T. Thrombin-induced autoinhibitory factor, Down syndrome critical region-1, attenuates NFAT-dependent vascular cell adhesion molecule-1 expression and inflammation in the endothelium. *The Journal of biological chemistry* **281**, 20503-20520 (2006).

141. Yang, J., Rothermel, B., Vega, R.B., Frey, N., McKinsey, T.A., Olson, E.N., *et al.* Independent signals control expression of the calcineurin inhibitory proteins MCIP1 and MCIP2 in striated muscles. *Circulation research* **87**, E61-68 (2000).
142. Yang, Y.J., Chen, W., Edgar, A., Li, B., Molkentin, J.D., Berman, J.N., *et al.* Rcan1 negatively regulates Fc epsilonRI-mediated signaling and mast cell function. *The Journal of experimental medicine* **206**, 195-207 (2009).
143. Ryeom, S., Baek, K.H., Rieth, M.J., Lynch, R.C., Zaslavsky, A., Birsner, A., *et al.* Targeted deletion of the calcineurin inhibitor DSCR1 suppresses tumor growth. *Cancer cell* **13**, 420-431 (2008).
144. Sanna, B., Brandt, E.B., Kaiser, R.A., Pfluger, P., Witt, S.A., Kimball, T.R., *et al.* Modulatory calcineurin-interacting proteins 1 and 2 function as calcineurin facilitators in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 7327-7332 (2006).
145. Bhoiwala, D.L., Kannabiran, V., Hushmendi, S.F., Hahn, A., Bhoiwala, D.L., Heuring, J.M., *et al.* The calcineurin inhibitor RCAN1 is involved in cultured macrophage and in vivo immune response. *FEMS immunology and medical microbiology* **61**, 103-113 (2011).
146. Junkins, R.D., MacNeil, A.J., Wu, Z., McCormick, C. & Lin, T.J. Regulator of calcineurin 1 suppresses inflammation during respiratory tract infections. *Journal of immunology* **190**, 5178-5186 (2013).
147. van Rooij, E., Doevendans, P.A., Crijns, H.J., Heeneman, S., Lips, D.J., van Bilsen, M., *et al.* MCIP1 overexpression suppresses left ventricular remodeling and sustains cardiac function after myocardial infarction. *Circulation research* **94**, e18-26 (2004).
148. Rothermel, B., Vega, R.B., Yang, J., Wu, H., Bassel-Duby, R. & Williams, R.S. A protein encoded within the Down syndrome critical region is enriched in striated muscles and inhibits calcineurin signaling. *The Journal of biological chemistry* **275**, 8719-8725 (2000).
149. Rothermel, B.A., McKinsey, T.A., Vega, R.B., Nicol, R.L., Mammen, P., Yang, J., *et al.* Myocyte-enriched calcineurin-interacting protein, MCIP1, inhibits cardiac hypertrophy in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 3328-3333 (2001).
150. Rothermel, B.A., Vega, R.B. & Williams, R.S. The role of modulatory calcineurin-interacting proteins in calcineurin signaling. *Trends in cardiovascular medicine* **13**, 15-21 (2003).
151. Vega, R.B., Bassel-Duby, R. & Olson, E.N. Control of cardiac growth and function by calcineurin signaling. *The Journal of biological chemistry* **278**, 36981-36984 (2003).
152. Vega, R.B., Yang, J., Rothermel, B.A., Bassel-Duby, R. & Williams, R.S. Multiple domains of MCIP1 contribute to inhibition of calcineurin activity. *The Journal of biological chemistry* **277**, 30401-30407 (2002).
153. Vega, R.B., Rothermel, B.A., Weinheimer, C.J., Kovacs, A., Naseem, R.H., Bassel-Duby, R., *et al.* Dual roles of modulatory calcineurin-interacting protein 1 in cardiac hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 669-674 (2003).
154. Wang, Y., De Keulenaer, G.W., Weinberg, E.O., Muangman, S., Gualberto, A., Landschulz, K.T., *et al.* Direct biomechanical induction of endogenous calcineurin inhibitor Down Syndrome Critical Region-1 in cardiac myocytes. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **283**, H533-539 (2002).
155. Mendez-Barbero, N., Esteban, V., Villahoz, S., Escolano, A., Urso, K., Alfranca, A., *et al.* A major role for RCAN1 in atherosclerosis progression. *EMBO molecular medicine* **5**, 1901-1917 (2013).
156. Liu, J., Masuda, E.S., Tsuruta, L., Arai, N. & Arai, K. Two independent calcineurin-binding regions in the N-terminal domain of murine NF-ATx1 recruit calcineurin to murine NF-ATx1. *Journal of immunology* **162**, 4755-4761 (1999).
157. Zanin, M.P., Mackenzie, K.D., Peiris, H., Pritchard, M.A. & Keating, D.J. RCAN1 regulates vesicle recycling and quantal release kinetics via effects on calcineurin activity. *Journal of neurochemistry* **124**, 290-299 (2013).
158. Keating, D.J., Dubach, D., Zanin, M.P., Yu, Y., Martin, K., Zhao, Y.F., *et al.* DSCR1/RCAN1 regulates vesicle exocytosis and fusion pore kinetics: implications for Down syndrome and Alzheimer's disease. *Human molecular genetics* **17**, 1020-1030 (2008).
159. Lee, H.J., Kim, Y.S., Sato, Y. & Cho, Y.J. RCAN1-4 knockdown attenuates cell growth through the inhibition of Ras signaling. *FEBS letters* **583**, 2557-2564 (2009).
160. Porta, S., Marti, E., de la Luna, S. & Arbones, M.L. Differential expression of members of the RCAN family of calcineurin regulators suggests selective functions for these proteins in the brain. *The European journal of neuroscience* **26**, 1213-1226 (2007).
161. Porta, S., Serra, S.A., Huch, M., Valverde, M.A., Llorens, F., Estivill, X., *et al.* RCAN1 (DSCR1) increases neuronal susceptibility to oxidative stress: a potential pathogenic process in neurodegeneration. *Human molecular genetics* **16**, 1039-1050 (2007).
162. Cho, A., Haruyama, N. & Kulkarni, A.B. Generation of transgenic mice. *Current protocols in cell biology*

- Chapter 19**, Unit 19 11 (2009).
163. Haruyama, N., Cho, A. & Kulkarni, A.B. Overview: engineering transgenic constructs and mice. *Current protocols in cell biology* **Chapter 19**, Unit 19 10 (2009).
  164. Kumar, T.R., Larson, M., Wang, H., McDermott, J. & Bronshteyn, I. Transgenic mouse technology: principles and methods. *Methods in molecular biology* **590**, 335-362 (2009).
  165. Hogan, B., Costantini, F. & Lacy, E. *Manipulating the mouse embryo : a laboratory manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986).
  166. Sauer, B. Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system. *Methods* **14**, 381-392 (1998).
  167. Wirth, A., Benyo, Z., Lukasova, M., Leutgeb, B., Wettschureck, N., Gorbey, S., *et al.* G12-G13-LARG-mediated signaling in vascular smooth muscle is required for salt-induced hypertension. *Nature medicine* **14**, 64-68 (2008).
  168. Wang, Y., Nakayama, M., Pitulescu, M.E., Schmidt, T.S., Bochenek, M.L., Sakakibara, A., *et al.* Ephrin-B2 controls VEGF-induced angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature* **465**, 483-486 (2010).
  169. Ruzankina, Y., Pinzon-Guzman, C., Asare, A., Ong, T., Pontano, L., Cotsarelis, G., *et al.* Deletion of the developmentally essential gene ATR in adult mice leads to age-related phenotypes and stem cell loss. *Cell stem cell* **1**, 113-126 (2007).
  170. Metzger, D. & Chambon, P. Site- and time-specific gene targeting in the mouse. *Methods* **24**, 71-80 (2001).
  171. Martin-McNulty, B., Vincelette, J., Vergona, R., Sullivan, M.E. & Wang, Y.X. Noninvasive measurement of abdominal aortic aneurysms in intact mice by a high-frequency ultrasound imaging system. *Ultrasound in medicine & biology* **31**, 745-749 (2005).
  172. Egawa, G., Nakamizo, S., Natsuaki, Y., Doi, H., Miyachi, Y. & Kabashima, K. Intravital analysis of vascular permeability in mice using two-photon microscopy. *Scientific reports* **3**, 1932 (2013).
  173. Ray, J.L., Leach, R., Herbert, J.M. & Benson, M. Isolation of vascular smooth muscle cells from a single murine aorta. *Methods in cell science : an official journal of the Society for In Vitro Biology* **23**, 185-188 (2001).
  174. Fehrenbach, M.L., Cao, G., Williams, J.T., Finklestein, J.M. & Delisser, H.M. Isolation of murine lung endothelial cells. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* **296**, L1096-1103 (2009).
  175. Sobczak, M., Dargatz, J. & Chrzanowska-Wodnicka, M. Isolation and culture of pulmonary endothelial cells from neonatal mice. *Journal of visualized experiments : JoVE* (2010).
  176. Cheung, A.L. Isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). *Current protocols in microbiology* **Appendix 4**, Appendix 4B (2007).
  177. Escolano, A., Martinez-Martinez, S., Alfranca, A., Urso, K., Izquierdo, H.M., Delgado, M., *et al.* Specific calcineurin targeting in macrophages confers resistance to inflammation via MKP-1 and p38. *The EMBO journal* **33**, 1117-1133 (2014).
  178. Villarroya-Beltri, C., Gutierrez-Vazquez, C., Sanchez-Cabo, F., Perez-Hernandez, D., Vazquez, J., Martin-Cofreces, N., *et al.* Sumoylated hnRNP A2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nature communications* **4**, 2980 (2013).
  179. Martinez-Bartolome, S., Navarro, P., Martin-Maroto, F., Lopez-Ferrer, D., Ramos-Fernandez, A., Villar, M., *et al.* Properties of average score distributions of SEQUEST: the probability ratio method. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **7**, 1135-1145 (2008).
  180. Navarro, P. & Vazquez, J. A refined method to calculate false discovery rates for peptide identification using decoy databases. *Journal of proteome research* **8**, 1792-1796 (2009).
  181. Bonzon-Kulichenko, E., Garcia-Marques, F., Trevisan-Herraz, M. & Vazquez, J. Revisiting peptide identification by high-accuracy mass spectrometry: problems associated with the use of narrow mass precursor windows. *Journal of proteome research* **14**, 700-710 (2015).
  182. Richardson, J.T. The analysis of 2 x 2 contingency tables--yet again. *Statistics in medicine* **30**, 890; author reply 891-892 (2011).
  183. Evangelista, A., Mukherjee, D., Mehta, R.H., O'Gara, P.T., Fattori, R., Cooper, J.V., *et al.* Acute intramural hematoma of the aorta: a mystery in evolution. *Circulation* **111**, 1063-1070 (2005).
  184. Rateri, D.L., Davis, F.M., Balakrishnan, A., Howatt, D.A., Moorleggen, J.J., O'Connor, W.N., *et al.* Angiotensin II induces region-specific medial disruption during evolution of ascending aortic aneurysms. *The American journal of pathology* **184**, 2586-2595 (2014).
  185. Julius, S. Amlodipine in hypertension: an overview of the clinical dossier. *Journal of cardiovascular pharmacology* **12 Suppl 7**, S27-33 (1988).
  186. Morton, J.J., Beattie, E.C., Speirs, A. & Gulliver, F. Persistent hypertension following inhibition of nitric oxide formation in the young Wistar rat: role of renin and vascular hypertrophy. *Journal of hypertension* **11**,

- 1083-1088 (1993).
187. Evangelista, A., Salas, A., Ribera, A., Ferreira-Gonzalez, I., Cuellar, H., Pineda, V., *et al.* Long-term outcome of aortic dissection with patent false lumen: predictive role of entry tear size and location. *Circulation* **125**, 3133-3141 (2012).
188. Litmanovich, D., Bankier, A.A., Cantin, L., Raptopoulos, V. & Boiselle, P.M. CT and MRI in diseases of the aorta. *AJR. American journal of roentgenology* **193**, 928-940 (2009).
189. Sonesson, B., Lanne, T., Hansen, F. & Sandgren, T. Infrarenal aortic diameter in the healthy person. *European journal of vascular surgery* **8**, 89-95 (1994).
190. Zhang, Y., Moreland, S. & Moreland, R.S. Regulation of vascular smooth muscle contraction: myosin light chain phosphorylation dependent and independent pathways. *Canadian journal of physiology and pharmacology* **72**, 1386-1391 (1994).
191. Jiang, W., Betson, M., Mulloy, R., Foster, R., Levay, M., Ligeti, E., *et al.* p190A RhoGAP is a glycogen synthase kinase-3-beta substrate required for polarized cell migration. *The Journal of biological chemistry* **283**, 20978-20988 (2008).
192. Sun, T., Rodriguez, M. & Kim, L. Glycogen synthase kinase 3 in the world of cell migration. *Development, growth & differentiation* **51**, 735-742 (2009).
193. Song, W.J., Song, E.A., Jung, M.S., Choi, S.H., Baik, H.H., Jin, B.K., *et al.* Phosphorylation and inactivation of glycogen synthase kinase 3beta (GSK3beta) by dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A (Dyrk1A). *The Journal of biological chemistry* **290**, 2321-2333 (2015).
194. van Kappel, E.C. & Maurice, M.M. Molecular regulation and pharmacological targeting of the beta-catenin destruction complex. *British journal of pharmacology* **174**, 4575-4588 (2017).
195. Freland, L. & Beaulieu, J.M. Inhibition of GSK3 by lithium, from single molecules to signaling networks. *Frontiers in molecular neuroscience* **5**, 14 (2012).
196. Conde, S., Perez, D.I., Martinez, A., Perez, C. & Moreno, F.J. Thienyl and phenyl alpha-halomethyl ketones: new inhibitors of glycogen synthase kinase (GSK-3beta) from a library of compound searching. *Journal of medicinal chemistry* **46**, 4631-4633 (2003).
197. Hsu, G.L., Hsieh, C.H., Wen, H.S., Hsu, W.L., Wu, C.H., Fong, T.H., *et al.* Anatomy of the human penis: the relationship of the architecture between skeletal and smooth muscles. *Journal of andrology* **25**, 426-431 (2004).
198. Revenig, L., Leung, A. & Hsiao, W. Ejaculatory physiology and pathophysiology: assessment and treatment in male infertility. *Translational andrology and urology* **3**, 41-49 (2014).
199. Uchida, K., Imoto, K., Karube, N., Minami, T., Cho, T., Goda, M., *et al.* Intramural haematoma should be referred to as thrombosed-type aortic dissection. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery* **44**, 366-369; discussion 369 (2013).
200. Sheppard, M.B., Daugherty, A. & Lu, H. Insights into ascending aortic aneurysm pathogenesis using in vivo and ex vivo imaging systems in angiotensin II-infused mice. *Journal of thoracic disease* **8**, E822-824 (2016).
201. Chen, X., Lu, H., Rateri, D.L., Cassis, L.A. & Daugherty, A. Conundrum of angiotensin II and TGF-beta interactions in aortic aneurysms. *Current opinion in pharmacology* **13**, 180-185 (2013).
202. Daugherty, A., Manning, M.W. & Cassis, L.A. Angiotensin II promotes atherosclerotic lesions and aneurysms in apolipoprotein E-deficient mice. *The Journal of clinical investigation* **105**, 1605-1612 (2000).
203. Weintraub, N.L. Understanding abdominal aortic aneurysm. *The New England journal of medicine* **361**, 1114-1116 (2009).
204. Ermak, G., Harris, C.D. & Davies, K.J. The DSCR1 (Adapt78) isoform 1 protein calcipressin 1 inhibits calcineurin and protects against acute calcium-mediated stress damage, including transient oxidative stress. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **16**, 814-824 (2002).
205. Martin, K.R., Layton, D., Seach, N., Corlett, A., Barallobre, M.J., Arbones, M.L., *et al.* Upregulation of RCAN1 causes Down syndrome-like immune dysfunction. *Journal of medical genetics* **50**, 444-454 (2013).
206. Sobrado, M., Ramirez, B.G., Neria, F., Lizasoain, I., Arbones, M.L., Minami, T., *et al.* Regulator of calcineurin 1 (Rcan1) has a protective role in brain ischemia/reperfusion injury. *Journal of neuroinflammation* **9**, 48 (2012).
207. Nakayama, H., Nishida, K. & Otsu, K. Macromolecular Degradation Systems and Cardiovascular Aging. *Circulation research* **118**, 1577-1592 (2016).
208. Tan, W.S.D., Liao, W., Zhou, S., Mei, D. & Wong, W.F. Targeting the renin-angiotensin system as novel

- therapeutic strategy for pulmonary diseases. *Current opinion in pharmacology* **40**, 9-17 (2017).
209. van Thiel, B.S., van der Pluijm, I., te Riet, L., Essers, J. & Danser, A.H. The renin-angiotensin system and its involvement in vascular disease. *European journal of pharmacology* **763**, 3-14 (2015).
210. Chen, X., Rateri, D.L., Howatt, D.A., Balakrishnan, A., Moorleghen, J.J., Morris, A.J., *et al.* Amlodipine reduces AngII-induced aortic aneurysms and atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *PLoS one* **8**, e81743 (2013).
211. Fares, H., DiNicolantonio, J.J., O'Keefe, J.H. & Lavie, C.J. Amlodipine in hypertension: a first-line agent with efficacy for improving blood pressure and patient outcomes. *Open heart* **3**, e000473 (2016).
212. Kerins, G., Petrovic, K., Bruder, M.B. & Gruman, C. Medical conditions and medication use in adults with Down syndrome: a descriptive analysis. *Down's syndrome, research and practice : the journal of the Sarah Duffen Centre* **12**, 141-147 (2008).
213. Morrison, R.A., McGrath, A., Davidson, G., Brown, J.J., Murray, G.D. & Lever, A.F. Low blood pressure in Down's syndrome, A link with Alzheimer's disease? *Hypertension* **28**, 569-575 (1996).
214. Richards, B.W. & Enver, F. Blood pressure in Down's syndrome. *Journal of mental deficiency research* **23**, 123-135 (1979).
215. Murdoch, J.C., Rodger, J.C., Rao, S.S., Fletcher, C.D. & Dunnigan, M.G. Down's syndrome: an atheroma-free model? *British medical journal* **2**, 226-228 (1977).
216. Yla-Herttuala, S., Luoma, J., Nikkari, T. & Kivimaki, T. Down's syndrome and atherosclerosis. *Atherosclerosis* **76**, 269-272 (1989).
217. Draheim, C.C., Geijer, J.R. & Dengel, D.R. Comparison of intima-media thickness of the carotid artery and cardiovascular disease risk factors in adults with versus without the Down syndrome. *The American journal of cardiology* **106**, 1512-1516 (2010).
218. Cheuk, B.L. & Cheng, S.W. Differential expression of elastin assembly genes in patients with Stanford Type A aortic dissection using microarray analysis. *Journal of vascular surgery* **53**, 1071-1078 e1072 (2011).
219. Muller, B.T., Modlich, O., Prisack, H.B., Bojar, H., Schipke, J.D., Goecke, T., *et al.* Gene expression profiles in the acutely dissected human aorta. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery* **24**, 356-364 (2002).
220. Wang, L., Yao, L., Guo, D., Wang, C., Wan, B., Ji, G., *et al.* Gene expression profiling in acute Stanford type B aortic dissection. *Vascular and endovascular surgery* **46**, 300-309 (2012).
221. Mohamed, S.A., Sievers, H.H., Hanke, T., Richardt, D., Schmidtke, C., Charitos, E.I., *et al.* Pathway analysis of differentially expressed genes in patients with acute aortic dissection. *Biomarker insights* **4**, 81-90 (2009).
222. Yang, P., Schmit, B.M., Fu, C., DeSart, K., Oh, S.P., Berceli, S.A., *et al.* Smooth muscle cell-specific Tgfb $\beta$ 1 deficiency promotes aortic aneurysm formation by stimulating multiple signaling events. *Scientific reports* **6**, 35444 (2016).
223. Song, J.K. Update in acute aortic syndrome: intramural hematoma and incomplete dissection as new disease entities. *Journal of cardiology* **64**, 153-161 (2014).
224. Mollmark, J.I., Park, A.J., Kim, J., Wang, T.Z., Katzenell, S., Shipman, S.L., *et al.* Fibroblast growth factor-2 is required for vasa vasorum plexus stability in hypercholesterolemic mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **32**, 2644-2651 (2012).
225. Rademakers, T., Douma, K., Hackeng, T.M., Post, M.J., Sluimer, J.C., Daemen, M.J., *et al.* Plaque-associated vasa vasorum in aged apolipoprotein E-deficient mice exhibit proatherogenic functional features in vivo. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **33**, 249-256 (2013).
226. Ritman, E.L. & Lerman, A. The dynamic vasa vasorum. *Cardiovascular research* **75**, 649-658 (2007).
227. Mulligan-Kehoe, M.J. The vasa vasorum in diseased and nondiseased arteries. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **298**, H295-305 (2010).
228. Wang, J., Wang, X., Gong, W., Mi, B., Liu, S. & Jiang, B. Increased expression of beta-catenin, phosphorylated glycogen synthase kinase 3 $\beta$ , cyclin D1, and c-myc in laterally spreading colorectal tumors. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* **57**, 363-371 (2009).
229. Burgoyne, J.R. & Eaton, P. Oxidant sensing by protein kinases a and g enables integration of cell redox state with phosphoregulation. *Sensors* **10**, 2731-2751 (2010).
230. Cui, W.J., Liu, Y., Zhou, X.L., Wang, F.Z., Zhang, X.D. & Ye, L.H. Myosin light chain kinase is responsible for high proliferative ability of breast cancer cells via anti-apoptosis involving p38 pathway. *Acta pharmacologica Sinica* **31**, 725-732 (2010).
231. Eldawody, H., Shimizu, H., Kimura, N., Saito, A., Nakayama, T., Takahashi, A., *et al.* Fasudil, a Rho-kinase inhibitor, attenuates induction and progression of cerebral aneurysms: experimental study in rats

- using vascular corrosion casts. *Neuroscience letters* **470**, 76-80 (2010).
232. Raja, S.G. Evaluation of clinical efficacy of fasudil for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *Recent patents on cardiovascular drug discovery* **7**, 100-104 (2012).
233. De Meyer, G.R. & Bult, H. Mechanisms of neointima formation--lessons from experimental models. *Vascular medicine* **2**, 179-189 (1997).
234. Flamant, S. & Tamarat, R. Extracellular Vesicles and Vascular Injury: New Insights for Radiation Exposure. *Radiation research* **186**, 203-218 (2016).
235. Billaud, M., Lohman, A.W., Johnstone, S.R., Biwer, L.A., Mutchler, S. & Isakson, B.E. Regulation of cellular communication by signaling microdomains in the blood vessel wall. *Pharmacological reviews* **66**, 513-569 (2014).



Anexo I







# A major role for RCAN1 in atherosclerosis progression

Nerea Méndez-Barbero<sup>1†</sup>, Vanesa Esteban<sup>1†</sup>, Silvia Villahoz<sup>1</sup>, Amelia Escolano<sup>1</sup>, Katia Urso<sup>1</sup>, Arantzazu Alfranca<sup>2</sup>, Cristina Rodríguez<sup>3</sup>, Susana A. Sánchez<sup>4§</sup>, Tsuyoshi Osawa<sup>5</sup>, Vicente Andrés<sup>6</sup>, José Martínez-González<sup>3</sup>, Takashi Minami<sup>5</sup>, Juan Miguel Redondo<sup>1\*,†</sup>, Miguel R. Campanero<sup>7\*\*†</sup>

Keywords: atherosclerosis; hypercholesterolemia; inflammation; macrophage; RCAN1

DOI 10.1002/emmm.201302842

Received April 04, 2013  
Revised August 08, 2013  
Accepted September 03, 2013

Atherosclerosis is a complex inflammatory disease involving extensive vascular vessel remodelling and migration of vascular cells. As RCAN1 is implicated in cell migration, we investigated its contribution to atherosclerosis. We show RCAN1 induction in atherosclerotic human and mouse tissues. Rcan1 was expressed in lesional macrophages, endothelial cells and vascular smooth muscle cells and was induced by treatment of these cells with oxidized LDLs (oxLDLs). Rcan1 regulates CD36 expression and its genetic inactivation reduced atherosclerosis extension and severity in *Apoe*<sup>-/-</sup> mice. This effect was mechanistically linked to diminished oxLDL uptake, resistance to oxLDL-mediated inhibition of macrophage migration and increased lesional IL-10 and mannose receptor expression. Moreover, *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> macrophages expressed higher-than-*Apoe*<sup>-/-</sup> levels of anti-inflammatory markers. We previously showed that Rcan1 mediates aneurysm development and that its expression is not required in haematopoietic cells for this process. However, transplantation of *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> bone-marrow (BM) cells into *Apoe*<sup>-/-</sup> recipients confers atherosclerosis resistance. Our data define a major role for haematopoietic Rcan1 in atherosclerosis and suggest that therapies aimed at inhibiting RCAN1 expression or function might significantly reduce atherosclerosis burden.

## INTRODUCTION

Atherosclerosis, the underlying cause of myocardial infarction, stroke and peripheral vascular disease, is the major cause of morbidity and mortality in the developed world. The initial steps of atherosclerosis are characterized by the subendothelial accumulation of apolipoprotein B-containing low-density lipoproteins (LDLs) in the artery wall. The oxidative modification of these lipoproteins [oxidized LDL (oxLDL)] triggers the activation of the vascular endothelium and drives an influx of monocytes to the vascular intima, where they differentiate into macrophages and phagocytose oxLDL (Hansson & Hermansson, 2011). Although in other contexts macrophages egress from the inflammation site after engulfing unwanted

proteins (LDLs) in the artery wall. The oxidative modification of these lipoproteins [oxidized LDL (oxLDL)] triggers the activation of the vascular endothelium and drives an influx of monocytes to the vascular intima, where they differentiate into macrophages and phagocytose oxLDL (Hansson & Hermansson, 2011). Although in other contexts macrophages egress from the inflammation site after engulfing unwanted

(1) Department of Vascular Biology and Inflammation, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Madrid, Spain

(2) Human Genetics Department, Institute for Rare Diseases Research, Carlos III Health Institute, Madrid, Spain

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

(4) Microscopy and Dynamic Imaging Unit, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Madrid, Spain

(5) Division of Vascular Biology, The Research Center for Advanced Science and Technology (RCAST), The University of Tokyo, Tokyo, Japan

(6) Department of Epidemiology, Atherothrombosis and Imaging, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Madrid, Spain

(7) Department of Cancer Biology, Instituto de Investigaciones Biomedicas Alberto Sols, CSIC-UAM, Madrid, Spain

\*Corresponding author: Tel: +34 91 4531200, Ext. 1150;

Fax: +34 91 4531265;

E-mail: jmredondo@cnic.es

\*\*Corresponding author: Tel: +34 91 5854490; Fax: +34 91 5854401;

E-mail: mcampanero@iib.uam.es

†These authors contributed equally to this work.

‡JMR and MRC contributed equally as corresponding and senior authors.

§Present address: Department of polymers, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Concepcion, Concepcion, Chile

material, in an atherosclerotic plaque the loading of oxLDL into macrophages shifts them to a more sessile, foam-cell phenotype, and these foam cells do not leave the lesion after clearing the lipids (Angeli et al, 2004; Randolph, 2008). The trapping of cholesterol-engorged foam cells causes the plaque to expand through the recruitment of additional leukocytes and vascular smooth muscle cells (VSMCs). As these lesions mature they continue to accumulate extracellular lipids, and the central core of the mature plaque becomes necrotic. Rupture of plaques produce acute coronary syndromes, unstable angina, myocardial infarction and sudden death (Libby, 2002).

Monocytes/macrophages are a relatively heterogeneous population, and the existence of at least two broad classes of macrophage phenotype has been proposed: proinflammatory macrophages (classically activated or M1) and those involved in resolution and repair (alternatively activated or M2) (Gordon & Taylor, 2005). M2 macrophages produce low levels of pro-inflammatory cytokines but high levels of arginase1 (Arg1), mannose receptor (Mrc1 or CD206) and IL10, and have a higher phagocytic capacity and a lower antigen presentation capacity than M1 macrophages (Gordon & Taylor, 2005). The existence of other macrophage phenotypes has been proposed that fit neither the classical nor the alternative activation pattern (Mosser & Edwards, 2008). The heterogeneity of atherosclerotic plaque macrophages has been recognized for many years and several types of macrophages have been found in atherosclerotic lesions (Bouhlef et al, 2007; Khallou-Laschet et al, 2010).

Regulator of calcineurin 1 (RCAN1) belongs to a family of endogenous regulators of calcineurin activity (RCAN; previously known as DSCR/MCIP/calciopressin/Adapt78 in mammals) (Davies et al, 2007). The RCAN1 protein is highly conserved (Davies et al, 2007), displaying 96% identity between human and mouse (Strippoli et al, 2000). The human and mouse RCAN1 genes are expressed as two isoforms, RCAN1-1 and RCAN1-4, that differ at their N terminus as a consequence of alternative promoter usage and first exon usage (Davies et al, 2007; Fuentes et al, 1997). RCAN1-1 and RCAN1-4 have different expression patterns and different regulation mechanisms control their expression. While RCAN1-1 seems to be constitutively expressed in most tissues, transcription of the RCAN1-4 variant is induced *de novo* by several stimuli that activate the calcineurin-NFAT pathway (Cano et al, 2005; Crawford et al, 1997; Ermak et al, 2002; Esteban et al, 2011; Minami et al, 2004; Wang et al, 2002; Yang et al, 2000). RCAN1 has been implicated in important physiological and pathological processes, including tumour growth and angiogenesis, sepsis, cardiac hypertrophy, mast-cell function, T-cell survival, and synaptic plasticity and memory (Baek et al, 2009; Harris et al, 2005; Hoeffler et al, 2007; Ryeom et al, 2008; Yang et al, 2009). Rcan1 additionally plays an essential role in the migration of VSMCs in response to angiotensin II stimulation; moreover, Rcan1 genetic ablation in the mouse confers resistance to abdominal aortic aneurysm and to neointima formation in a restenosis model (Esteban et al, 2011). Rcan1 in endothelial cells inhibits VEGF-induced migration and *in vitro* tube formation (Iizuka et al, 2004; Minami et al, 2004). In contrast, Rcan1 knockdown in cancer cell lines increases motility while its forced expression reduces their

motility and CN activity (Espinosa et al, 2009). Rcan1 thus appears to have opposite roles in cell migration in different settings. Since most studies have involved the simultaneous inactivation of Rcan1-1 and Rcan1-4 or have examined the effect of over-expressing or knocking-down only one of these isoforms, it has not yet been possible to ascribe specific roles to one Rcan1 isoform and not the other.

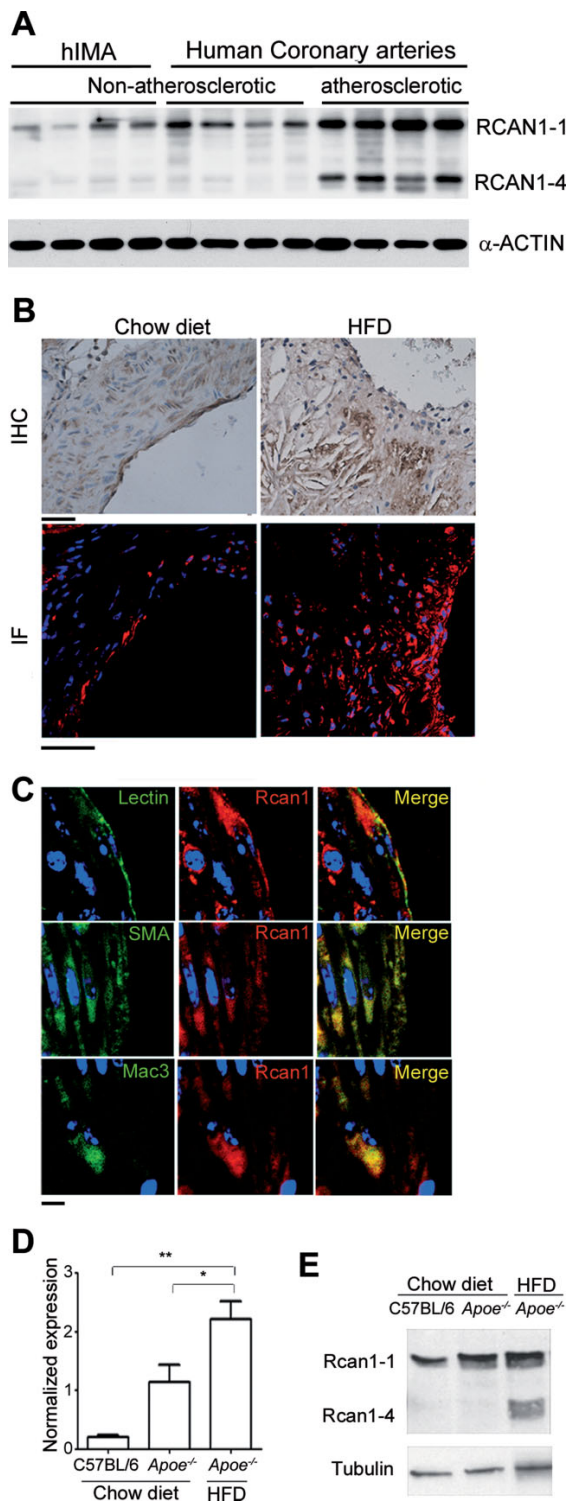
Here, we investigated the contribution of Rcan1 to atherosclerosis development. We show that RCAN1 is induced in human and mouse atherosclerotic tissues and, using a mouse model of atherosclerosis and bone-marrow (BM) transplantation assays, we demonstrate that Rcan1 in haematopoietic cells promotes atherosclerosis. We also present evidence that the pro-atherogenic action of Rcan1 is mediated by oxLDL-uptake and that macrophage polarization and trapping are central to its pro-atherogenic role.

## RESULTS

### RCAN1-4 is upregulated in human and mouse atherosclerosis lesions

To assess RCAN1 expression in human atherosclerotic lesions, we compared human atherosclerotic coronary arteries with non-atherosclerotic coronary arteries and internal mammary arteries, a vessel that does not develop atherosclerosis. RCAN1-4 protein expression was markedly higher in atherosclerotic vessels than in non-atherosclerotic coronary arteries and internal mammary arteries (Fig 1A). Although RCAN1-1 expression is usually constitutive, its level also appeared to be higher in atherosclerotic arteries, but the difference was less marked than for RCAN1-4 (Fig 1A). The protein expression differences were accompanied by correspondingly higher expression of RCAN1-1 and RCAN1-4 mRNA in atherosclerotic arteries (Fig S1 of Supporting Information).

To investigate the role of RCAN1 in atherogenesis, we used the *Apoe*<sup>-/-</sup> mouse model (Plump et al, 1992; Zhang et al, 1992). These mice develop atherosclerosis spontaneously, and the appearance of lesions is accelerated by feeding them a cholesterol-rich diet. Like human familial hypercholesterolemia patients, these mice develop lesions in the aortic valves (Getz & Reardon, 2012). We fed 3-month old *Apoe*<sup>-/-</sup> mice a high-fat diet (HFD) for 6 weeks and compared Rcan1 expression in the aortic valves with that in wild-type and *Apoe*<sup>-/-</sup> mice fed a standard chow diet. Aortic valves of *Apoe*<sup>-/-</sup> mice fed an HFD showed marked Rcan1 staining in cells close to areas of lipid deposition, while staining was much weaker in the non-atherosclerotic valves of mice fed the control diet (Fig 1B, top panels). More intense Rcan1 expression in the valves of HFD-fed mice was also evident upon analysis by confocal immunofluorescence (Fig 1B, lower panels). Immunofluorescent staining of plaques for markers of endothelial cells, VSMCs and macrophages revealed elevated Rcan1 expression in all three cell types (Fig 1C). Quantitative PCR analysis of the aortic arch, which is also predisposed to lesion formation in mice, revealed higher Rcan1 expression in chow-fed *Apoe*<sup>-/-</sup> mice than in wt C57BL/6 mice, and expression was higher still in *Apoe*<sup>-/-</sup> mice fed an



**Figure 1. RCAN1-4 is induced in atherosclerotic human and mouse arteries.**

- A.** Immunoblot of RCAN1 in atherosclerotic and non-atherosclerotic human coronary artery and in human internal mammary artery (hIMA). Protein bands corresponding to RCAN1-1 and RCAN1-4 are indicated.  $\alpha$ -ACTIN was used as loading control.
- B.** The aortic sinus of *Apoe*<sup>-/-</sup> mice fed standard chow or a high-fat diet (HFD) was immunostained for Rcan1. Representative images are shown of Rcan1 immunohistochemistry (top panels) and fluorescence microscopy (bottom panels). Bar, 50  $\mu$ m.
- C.** Representative confocal immunofluorescence images of Rcan1 (red), lectin (green),  $\alpha$ SMA (green) and Mac3 (green) in aortic sinus lesions of HFD-fed *Apoe*<sup>-/-</sup> mice. Merged images are also shown. Bar, 5  $\mu$ m.
- D.** Quantitative PCR analysis of *Rcan1* mRNA expression in the aortic arch of C57BL/6 and *Apoe*<sup>-/-</sup> mice fed standard chow or an HFD. mRNA amounts were normalized to *Hprt1* expression (means  $\pm$  SEM; n = 3). Student's t-test, \**p* = 0.013, \*\**p* = 0.0019.
- E.** Representative Rcan1 immunoblot in the same tissues as in D.

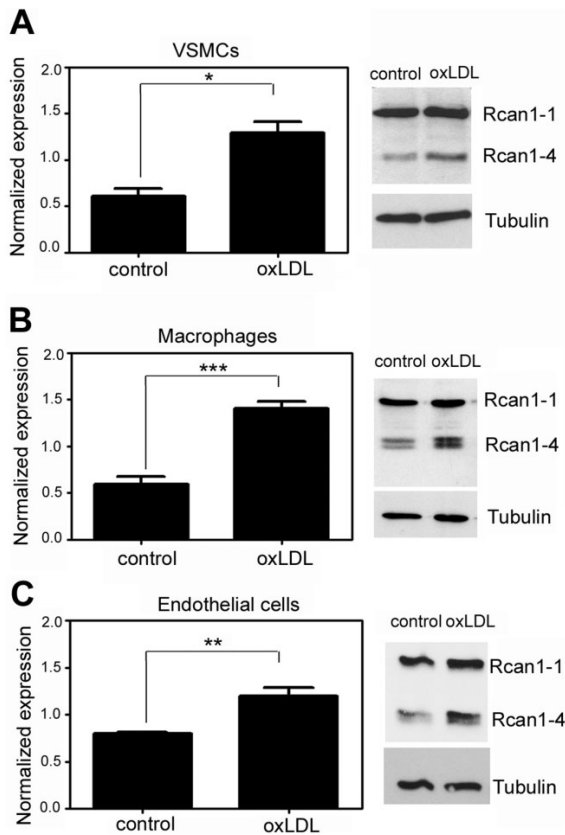
HFD (Fig 1D). As in human samples, western blot analysis of Rcan1 expression in the aortic arch of these animals indicated that Rcan1-4 was strongly induced in atherosclerotic mice (Fig 1E). In contrast, Rcan1-1 expression was barely affected in atherosclerosis (Fig 1E).

The subendothelial accumulation of oxLDLs is a crucial early event in plaque formation. We therefore determined whether oxLDL regulates Rcan1 expression in the major cell compartments present in the plaque. Treatment of mouse primary macrophages, VSMCs, and endothelial cells with oxLDL induced the expression of *Rcan1* mRNA and Rcan1-4 protein in all three cells types, but did not induce Rcan1-1 protein (Fig 2).

**Rcan1 inactivation reduces atherosclerotic lesion burden**

To investigate the contribution of Rcan1 to atheroma formation we compared *Apoe*<sup>-/-</sup> with *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> (double knock-out) mice. *Rcan1* targeting affected both isoforms and lack of expression was confirmed in aorta and heart (Fig S2 of Supporting Information). *Apoe*<sup>-/-</sup> and *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> mice showed similar body weight increases after 6 weeks on an HFD (Fig S3A of Supporting Information), and there were no significant inter-group differences in serum concentrations of triglyceride, total and free cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol and LDL cholesterol (Fig S3B–C of Supporting Information). *En face* analysis of Oil Red O stained atherosclerotic plaques revealed that aortic lesion size in *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> mice was significantly smaller than in *Apoe*<sup>-/-</sup> mice (Fig 3A). Since the aortic sinus and ascending aorta are particularly prone to atherosclerosis, we also compared atheroma formation in these regions. Haematoxylin and eosin (H&E) staining of cross-sections revealed a significantly smaller lesion area in both regions in *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> mice (Fig 3B–C).

To assess the progression of atheromas in *Apoe*<sup>-/-</sup> and *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> mice, we determined the presence of macrophages and VSMCs and the lipid deposition pattern in the aortic cusps, the region that contains the most advanced lesions in the *Apoe*-deficient model (Nakashima et al, 1994). The relative



**Figure 2. Induction of Rcan1-4 expression by oxLDL.** Quantitative PCR and representative immunoblot analysis of Rcan1 expression in cells isolated from *Apoe*<sup>-/-</sup> mice and treated with 50 µg/ml oxLDL:

- A.** VSMCs ( $n = 3$ ),  
**B.** Peritoneal macrophages ( $n = 3$ ) and  
**C.** Endothelial cells ( $n = 6$ ). mRNA amounts were normalized to *Hprt1* expression (means  $\pm$  SEM). Student's *t*-test, \* $p = 0.007$ , \*\* $p = 0.001$ , \*\*\* $p = 0.0003$ .

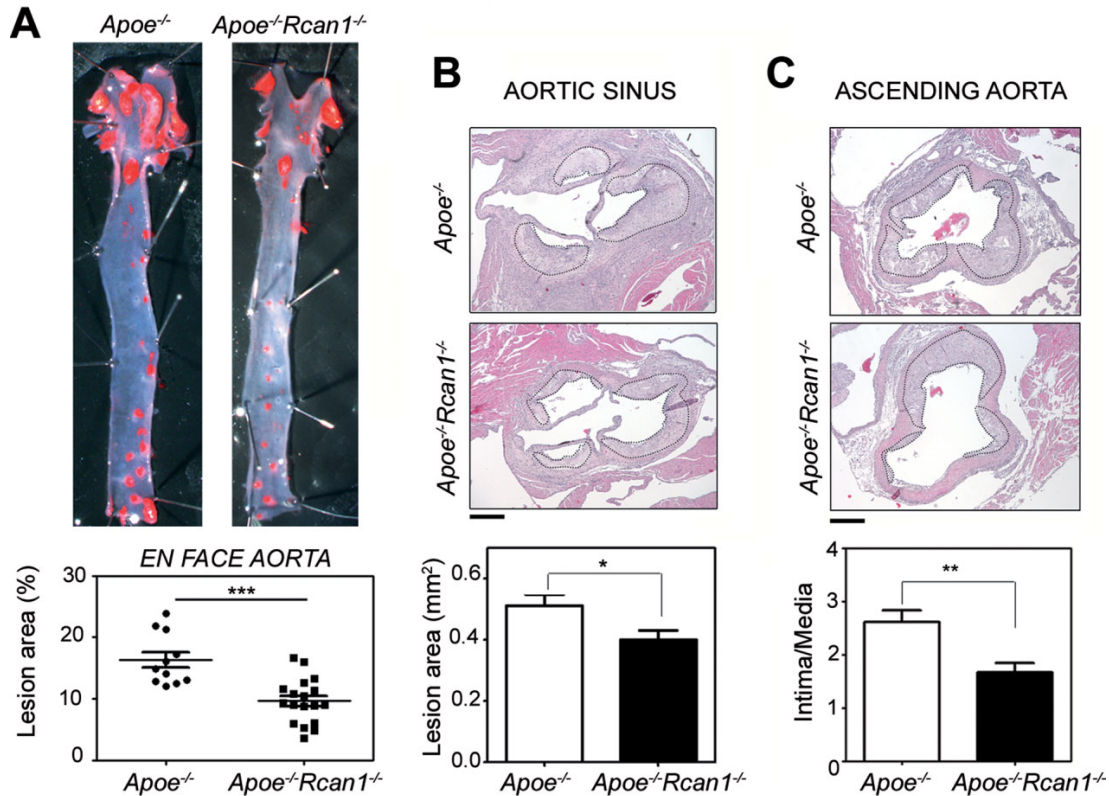
content of macrophages was lower in *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> plaques, whereas numbers of VSMCs were similar in the two genotypes (Fig 4A). To confirm that *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> mice had less-advanced plaques, we classified lesions according to the Stary method (Stary et al, 1994) into early plaques (grade I) containing only macrophages; grade II lesions containing macrophages, VSMCs and a few scattered cholesterol clefts; grade III lesions containing macrophages, VSMCs and numerous cholesterol clefts and advanced plaques (grade IV) containing macrophages, VSMCs and a large lipid core (Fig 4B). After 6 weeks of HFD,  $\approx 42\%$  plaques in *Apoe*<sup>-/-</sup> mice were grade IV and only  $\approx 14\%$  were grade I (Fig 4C). In contrast, the proportion of grade IV plaques in *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> mice was  $\approx 28\%$  and that of grade I plaques was  $\approx 31\%$  (Fig 4C). These results therefore indicate that Rcan1 plays a key role in atherosclerosis progression.

While *Rcan1* targeting generates less advanced atherosclerotic plaques, it might as well potentially decrease their stability. Although the *Apoe*<sup>-/-</sup> mouse is not particularly prone to develop unstable plaques in the aorta (Getz & Reardon, 2012), it was formally possible that Rcan1 deficiency might increase plaque vulnerability. We therefore determined the effect of Rcan1 targeting on plaque stability. A key feature of unstable plaques is thinning of the fibrous cap, usually accompanied by a reduction in collagen content. The extent and thickness of the fibrous cap, relative to plaque size, were larger in *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> mice than in *Apoe*<sup>-/-</sup> mice (Fig 5A and Fig S4 of Supporting Information), whereas the collagen content of the fibrous cap was similar in both genotypes (Fig 5B–C). Moreover, lipid content, determined by Oil Red staining, was lower in plaques of *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> mice (Fig 5B) and these plaques had a higher stability score (Fig 5D). Expression of metalloproteases MMP2 and MMP9, another index of plaque instability, was almost identical in *Apoe*<sup>-/-</sup> and *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> plaques (Fig S5 of Supporting Information) and no plaques displayed evidence of haemorrhage (Fig S6 of Supporting Information). These data, together with the lower macrophage content of Rcan1-deficient plaques, thus indicate that *Rcan1* targeting does not induce characteristics of unstable atherosclerotic plaques, and suggest instead that Rcan1 inactivation might increase plaque stability.

#### Rcan1 regulates CD36 expression and mediates foam-cell formation

Oil Red O staining of intracellular lipids indicated that while macrophages isolated from *Apoe*<sup>-/-</sup> and *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> mice engulfed unmodified LDL similarly (Fig 6A), fewer *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> macrophages engulfed oxLDL, and *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> macrophages also appeared to load less oxLDL per cell (Fig 6B). We measured intracellular oxLDL particles by Laurdan generalized polarization (Laurdan GP) (Sanchez et al, 2007; Sanchez et al, 2010), a confocal technique that measures water content inside lipid compartments. Intracellular oxLDLs are tightly packed and shift Laurdan GP towards red frequencies (Ferretti et al, 2002), whereas other lipid compartments, including intracellular membranes, contain more water and give a yellow or green signal (Sanchez et al, 2007; Sanchez et al, 2010). Macrophages exposed to oxLDL thus show its presence in the cytosol as red dots (Fig 6C). Quantification of the area occupied by oxLDL revealed that *Apoe*<sup>-/-</sup> macrophages took up  $\approx 2.5$  times more oxLDL than *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> cells (Fig 6C).

OxLDL uptake and foam-cell formation are mediated by the class A and B scavenger receptors SR-A and CD36 (Febbraio et al, 2000; Suzuki et al, 1997). Real-time PCR analysis detected significantly higher levels of CD36 in the aortic arches of *Apoe*<sup>-/-</sup> mice compared with *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> mice (Fig 6D), whereas expression of SR-A was similar in the two genotypes (Fig S7A of Supporting Information). Accordingly, flow cytometry analysis revealed that CD36 levels, but not those of SR-A, were significantly downregulated in *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> macrophages (Fig 6E and Fig S7B of Supporting Information). Lentiviral re-expression of Rcan1-1 and Rcan1-4 in *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> peritoneal macrophages (Fig 7A) increased cell surface



**Figure 3. Rcan1 deficiency decreases atherogenesis burden.**

**A.** Representative Oil red O staining and quantification of lesion area in the aortas of *Apoe*<sup>-/-</sup> ( $n = 11$ ) and *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> mice ( $n = 18$ ) fed an HFD for 6 weeks. Each data point denotes an individual mouse, and the horizontal bars denote the mean (long bar) and the SEM.

**B.** Representative H&E staining of the aortic sinus and quantification of the lesion area in this region (mean  $\pm$  SEM).

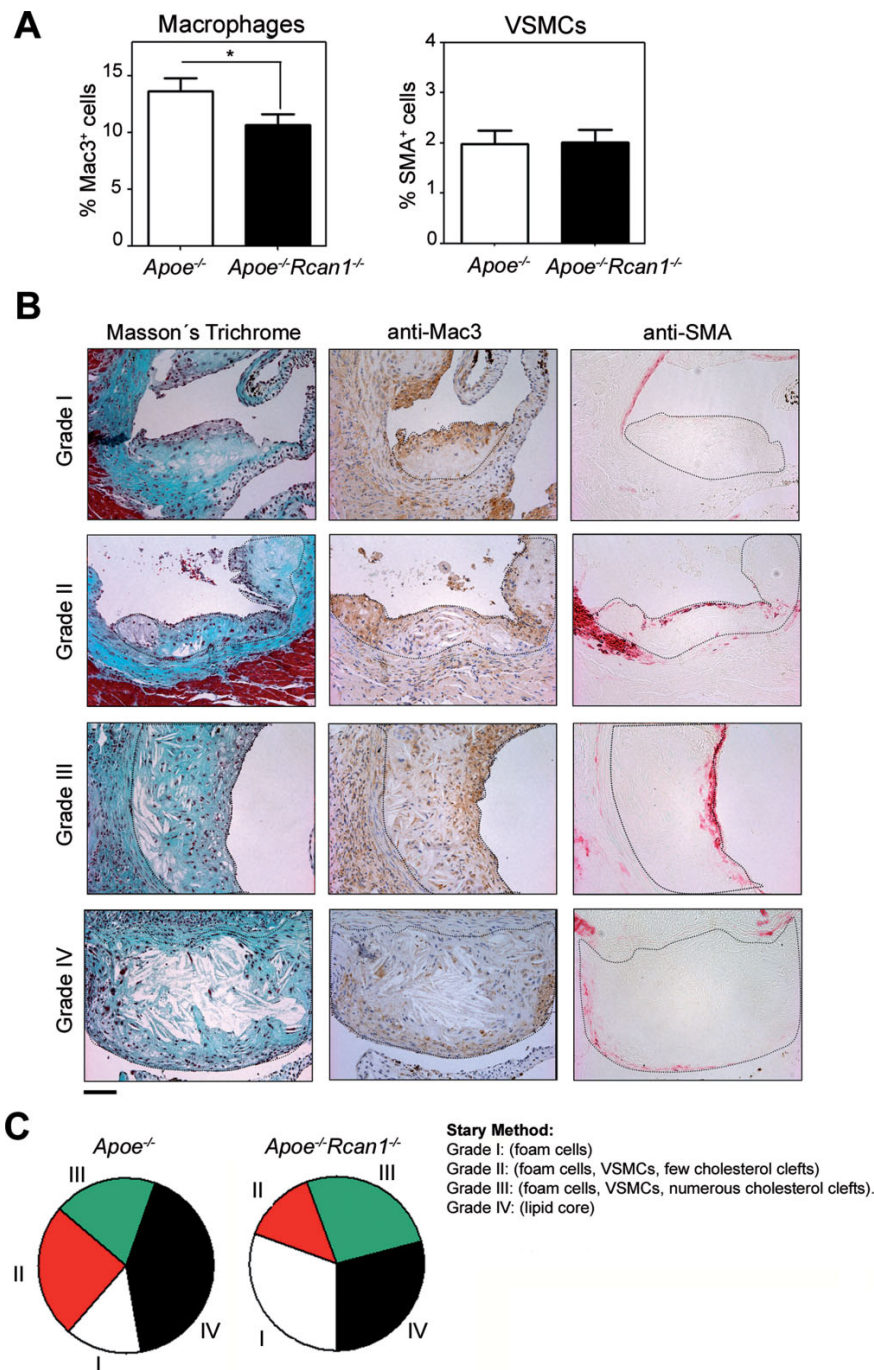
**C.** Representative H&E staining of the ascending aorta and quantification of lesion measured as intima/media ratio in this region in the same cohort of animals (mean  $\pm$  SEM). Bars, 200  $\mu$ m. Student's *t*-test, \* $p = 0.02$ , \*\* $p = 0.0025$ , \*\*\* $p = 0.0001$ .

expression of CD36 (Fig 7B) and concomitantly increased the numbers of oxLDL particles taken up by *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> peritoneal macrophages (Fig 7C–D). These results thus support that Rcan1 contributes to foam-cell formation by regulating CD36 expression.

Lipid accumulation by lesional macrophages can also reflect altered cholesterol efflux. To investigate the contribution of Rcan1 to cholesterol efflux, foam-cell formation was induced in *Apoe*<sup>-/-</sup> and *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> peritoneal macrophages by incubating them with particles of acetylated LDL (acLDL), a non-atherosclerotic modified form of LDL, in the presence of <sup>3</sup>H-cholesterol. *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> macrophages accumulated less <sup>3</sup>H-cholesterol (Fig S8A of Supporting Information). Addition of HDL to the foam-cell cultures promoted cholesterol efflux, and this effect was modestly stronger in Rcan1-deficient cells (Fig S8B of Supporting Information). Consistent with this effect, ABC transporter expression was slightly higher in *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> peritoneal macrophages and in atherosclerotic lesions in the aortic arch of these animals (Fig S8C–D of Supporting Information).

### Rcan1 regulates oxLDL-mediated inhibition of macrophage migration

The presence of macrophages in atheroma plaques depends not only on their recruitment, but also on their capacity to exit the plaque, a process strongly impaired by oxLDL (Angeli et al, 2004; Randolph, 2008). Since Rcan1 can either promote or repress cell migration (Espinosa et al, 2009; Iizuka et al, 2004; Minami et al, 2004), we first determined whether Rcan1 was required for chemotactic macrophage migration. *Apoe*<sup>-/-</sup> and *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> macrophages migrated similarly in Boyden Transwell chambers in response to MCP-1 or a combination of MCP-1 and fetal bovine serum (FBS) (Fig S9 of Supporting Information). We next investigated whether Rcan1 participated in oxLDL-elicited inhibition of macrophage chemotaxis. While exposure of *Apoe*<sup>-/-</sup> macrophages to oxLDL sharply reduced their migration towards the chemotactic stimulus, *Rcan1*-deficient macrophages were not affected (Fig 8A–B). Accordingly, in wound-healing assays oxLDL inhibited random migration of MCP1-treated *Apoe*<sup>-/-</sup> macrophages, but not that

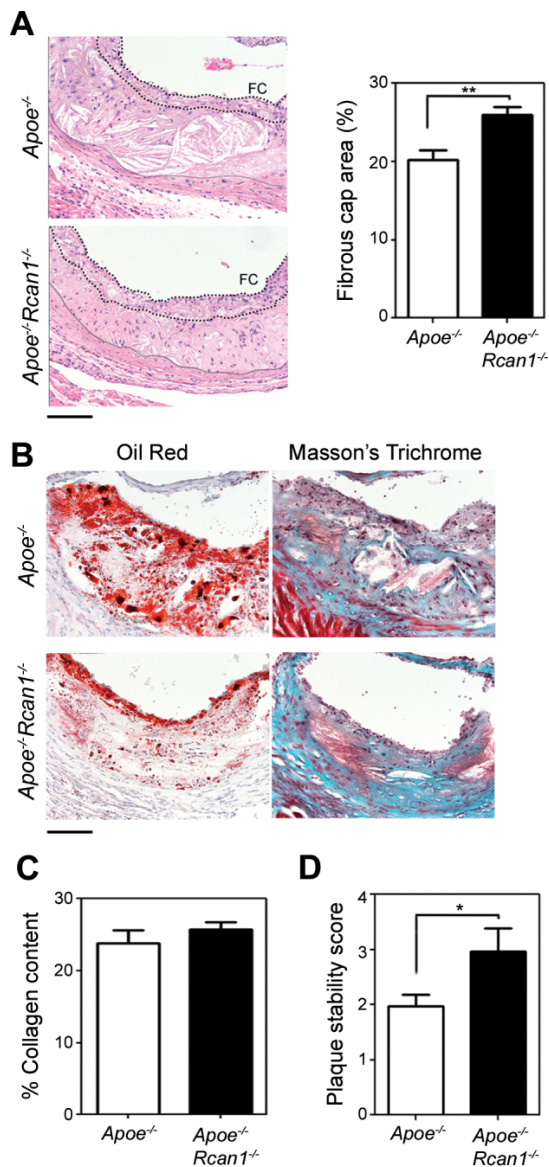


**Figure 4. Rcan1 deficiency results in less-advanced plaques.**

**A.** Quantification of neointimal macrophage and VSMC content in lesions of the aortic sinus of *Apoe*<sup>-/-</sup> (*n* = 11) and *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> mice (*n* = 18) fed an HFD for 6 weeks. Student's *t*-test, \**p* = 0.017.

**B.** Representative images of Masson's trichrome, anti-Mac3 and anti-SMA staining of lesions of the aortic sinus classified according to the Stary method: grade I (mostly foam cells), grade II (foam cells, VSMCs and few cholesterol clefts), grade III (foam cells, VSMCs and numerous cholesterol clefts) and grade IV (lipid core). Bars, 50 μm.

**C.** Classification of aortic sinus lesions according to the Stary method in the cohort of *Apoe*<sup>-/-</sup> and *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> animals shown in Fig 3.



**Figure 5. Rcan1 deficiency does not decrease plaque stability.**

- A.** Representative H&E staining and quantification of fibrous cap area of lesions in the aortic sinus of *Apoe*<sup>-/-</sup> (*n* = 25 valves) and *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> mice (*n* = 45 valves) fed an HFD for 6 weeks. Data are shown relative to the lesion area (means ± SEM). Student's *t*-test, \*\**p* = 0.0012. Thick and thin dotted lines, respectively, delimit the fibrous cap (FC) and lesion.
- B.** Representative images of Oil Red and Masson's trichrome staining of cryocut cross-sections of the aortic arch lesions of *Apoe*<sup>-/-</sup> (*n* = 15) and *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> mice (*n* = 17) fed an HFD for 6 weeks. Bar, 50 μm.
- C.** Quantification of collagen content in the fibrous cap of these lesions (mean ± SEM).
- D.** Plaque stability score determined by collagen content divided by Oil Red staining area of the same lesions (mean ± SEM; Student *t*-test, \**p* = 0.048).

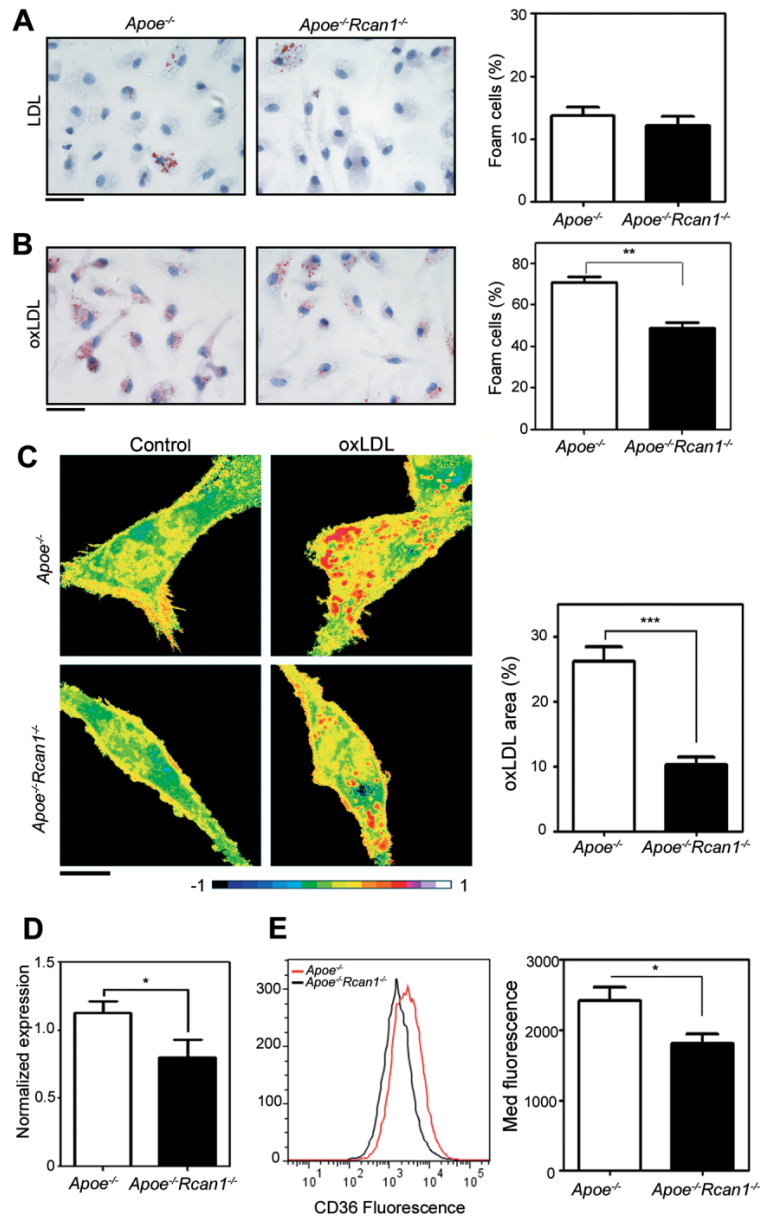
of *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> cells, as revealed by larger numbers of *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> cells invading the denuded area (Fig S10 of Supporting Information). In the Transwell assays neither LDL nor acLDL significantly altered migration of macrophages of either genotype towards the chemoattractant (Fig 8A–B). These data thus suggest that Rcan1 does not directly regulate macrophage migration, but is a central mediator of oxLDL-elicited inhibition of their egress from atherosclerotic plaques.

Cell migration is a complex process that involves cellular spreading and cycles of formation and disruption of focal adhesion contacts (Stossel, 1994). To characterize the mechanisms by which Rcan1 mediates oxLDL-induced inhibition of macrophage chemotaxis, we measured its role in oxLDL-induced cell spreading. Spreading of *Apoe*<sup>-/-</sup> macrophages, but not that of *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> cells, was readily induced within 30 min of exposure to oxLDL (Fig 8C). Automated quantification of macrophage spreading revealed significant differences between *Apoe*<sup>-/-</sup> and *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> macrophages from early time points (Fig 8D).

**Rcan1<sup>-/-</sup> macrophages express anti-inflammatory phenotype markers**

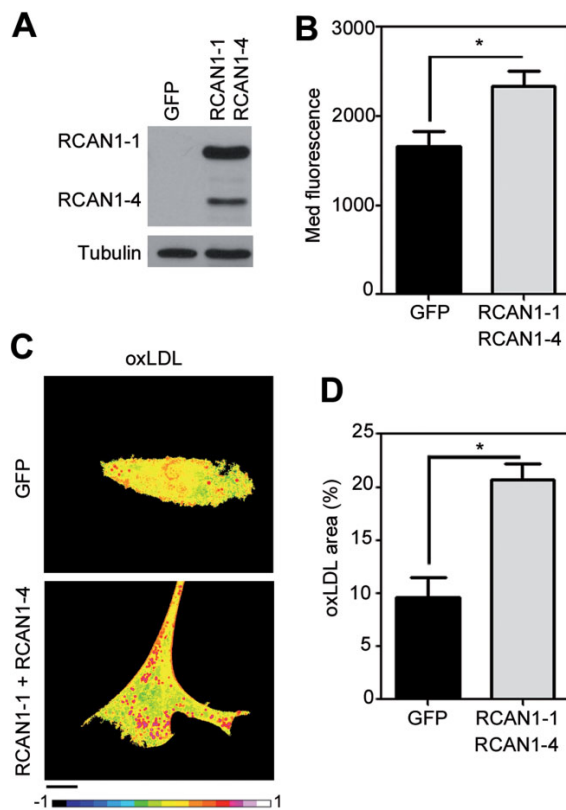
Although several types of macrophages have been detected in atherosclerotic lesions, macrophages with a classic M1-like pro-inflammatory phenotype appear to be the most abundant (Waldo et al, 2008). Given that oxLDL increases the expression of M1 markers (Chase et al, 2002) and *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> macrophages ingest oxLDL less efficiently than *Apoe*<sup>-/-</sup> macrophages, we postulated that atherosclerotic lesions of *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> mice might contain macrophages with a phenotype different from those of *Apoe*<sup>-/-</sup> mice. To test this, we analysed the expression of the anti-inflammatory phenotype markers *Mrc1* and *IL-10* in aortic cusps of *Apoe*<sup>-/-</sup> and *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> mice. Expression of both markers was higher in lesions from *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> mice (Fig 9A–B), and *IL-10* levels were also higher in the aortic arch of atherosclerotic *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> mice (Fig S11 of Supporting Information). These data suggest that lesions in *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> mice are enriched in macrophages with a rather anti-inflammatory phenotype.

We next investigated the possible participation of Rcan1 in macrophage polarization. Expression of *IL-10* and *Mrc1* was significantly higher in *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> macrophages compared with *Apoe*<sup>-/-</sup> cells (Fig 9C), whereas *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> macrophages expressed lower levels of *Mcp-1* levels (Fig 9C). Further consistent with an anti-inflammatory phenotype, *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> macrophages showed higher expression of *Arg1* (Fig S12A of Supporting Information), modestly lower antigen presentation (Fig S12B of Supporting Information) and higher phagocytic activity (Fig S12C of Supporting Information). *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> cells also expressed higher levels of *iNos*, a marker of pro-inflammatory M1 macrophages (Fig 9C), but *iNos* expression in atherosclerotic lesions of the aortic arch was almost identical in *Apoe*<sup>-/-</sup> and *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> mice (Fig S13 of Supporting Information). It thus seems that Rcan1 ablation might contribute to *iNos* induction by thioglycolate *ex vivo*, but not to its induction by proatherogenic stimuli *in vivo*.



**Figure 6. Rcan1 mediates macrophage uptake of oxLDL.**

- A, B.** *Apoe*<sup>-/-</sup> and *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> peritoneal macrophages were exposed to (A) native LDL or (B) oxLDL for 24 h and then Oil Red O stained. Representative images and quantification are shown of stained cells in three independent experiments (mean ± SEM; Student's *t*-test, \*\**p* = 0.0018). Bars, 20 μm.
- C.** *Apoe*<sup>-/-</sup> and *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> peritoneal macrophages cultured in medium alone (control) or containing oxLDL were stained with Laurdan. Representative Laurdan GP images are shown with quantification of the area covered by oxLDL (red dots) (*n* = 20; mean ± SEM; Student's *t*-test, \*\*\**p* = 0.0001). Black bar, 10 μm.
- D.** Quantitative PCR analysis of *CD36* expression in the aortic arch of atherosclerotic *Apoe*<sup>-/-</sup> (*n* = 12) and *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> mice (*n* = 13) pooled from three independent experiments. mRNA amounts were normalized to *m36B4* expression (means ± SEM). Student's *t*-test \**p* = 0.039.
- E.** Representative flow cytometry fluorescence histograms of CD36-stained macrophages of the indicated genotypes and quantification of the median fluorescence levels (*n* = 3; mean ± SEM; Student's *t*-test, \**p* = 0.036).



**Figure 7. Rcan1 re-expression in *Apoe*<sup>-/-</sup> *Rcan1*<sup>-/-</sup> macrophages increases CD36 expression and the uptake of oxLDL.** *Apoe*<sup>-/-</sup> *Rcan1*<sup>-/-</sup> peritoneal macrophages were transduced with lentiviruses encoding GFP or Rcan1-1-IRES-GFP plus Rcan1-4-IRES-GFP.

**A.** Representative immunoblot analysis of Rcan1 expression in these cells.  
**B.** Quantification of the normalized median fluorescence levels of CD36 determined by flow cytometry in the GFP<sup>+</sup> population ( $n = 4$ ; mean  $\pm$  SEM; Student's *t*-test  $*p = 0.02$ ).  
**C, D.** (C) Representative Laurdan GP images and (D) quantification of the area covered by oxLDL (red dots) in GFP-F4/80 double-positive cells after culture in the presence of oxLDL ( $n = 3$ ; mean  $\pm$  SEM; Student's *t*-test,  $*p = 0.01$ ). Scale bar, 10  $\mu$ m.

#### Transplantation of *Rcan1*<sup>-/-</sup> BM cells confers resistance to atherosclerosis

To test the possible promotion of atherosclerosis by macrophage-expressed Rcan1, we reconstituted the BM of 2-month old lethally irradiated *Apoe*<sup>-/-</sup> mice with BM-derived cells from *Apoe*<sup>-/-</sup> *Rcan1*<sup>-/-</sup> or *Apoe*<sup>-/-</sup> mice, thereby generating *Apoe*<sup>-/-</sup> mice with either *Apoe*<sup>-/-</sup> *Rcan1*<sup>-/-</sup> macrophages (*Rcan1*<sup>-/-</sup>  $\rightarrow$  *Apoe*<sup>-/-</sup>) or *Apoe*<sup>-/-</sup> *Rcan1*<sup>+/+</sup> macrophages (*Rcan1*<sup>+/+</sup>  $\rightarrow$  *Apoe*<sup>-/-</sup>). Since RCAN1 has been reported to induce GSK3 $\beta$  expression (Ermak et al, 2006) and this protein modulates haematopoietic progenitor cell function (Lapid et al, 2013), it is formally possible that Rcan1 ablation influences the nature of BM reconstitution. However, chimeric *Rcan1*<sup>-/-</sup>  $\rightarrow$  *Apoe*<sup>-/-</sup> mice showed no significant reduction in

Gsk3 $\beta$  expression (Fig S14A of Supporting Information), and blood cell populations of reconstituted *Rcan1*<sup>+/+</sup>  $\rightarrow$  *Apoe*<sup>-/-</sup> and *Rcan1*<sup>-/-</sup>  $\rightarrow$  *Apoe*<sup>-/-</sup> mice were indistinguishable (Fig S14B-D of Supporting Information).

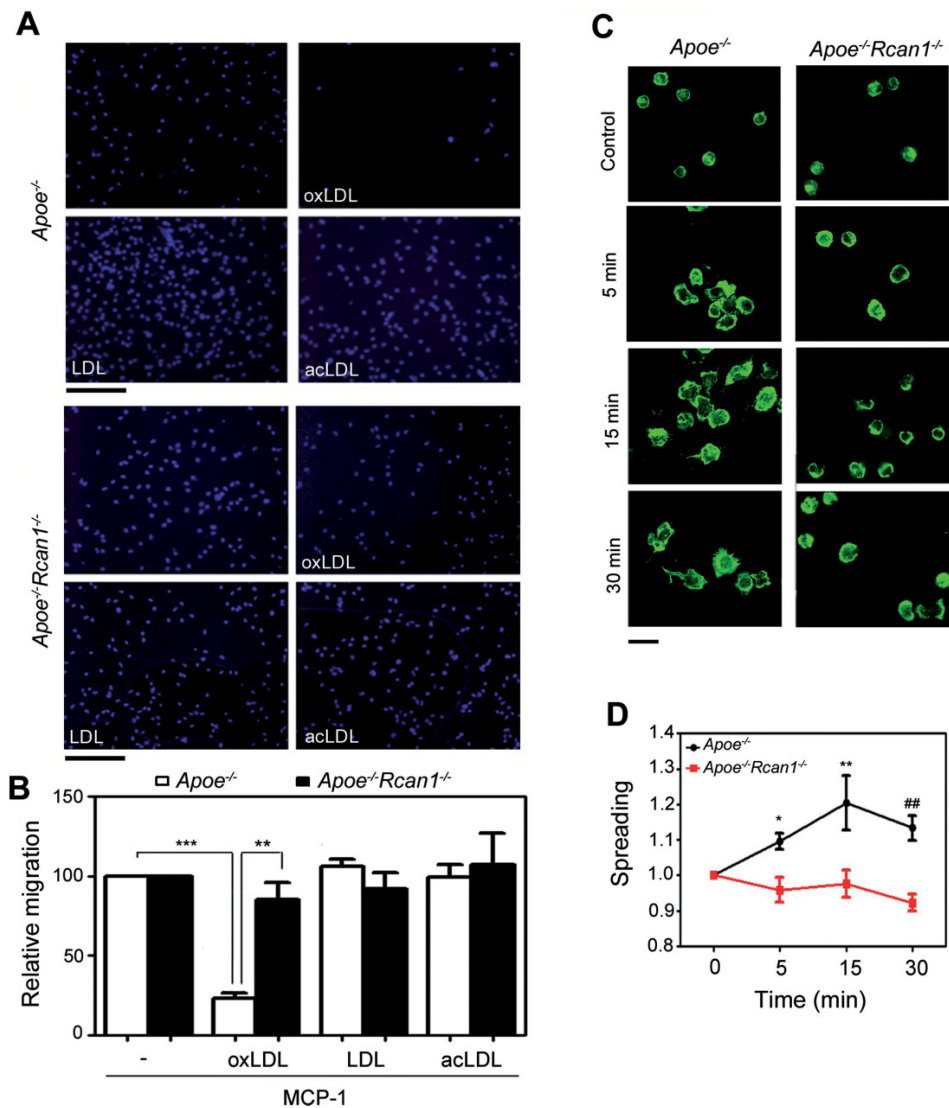
After reconstitution for 4 week, mice were fed an HFD for 6 weeks. Chimeric *Rcan1*<sup>-/-</sup>  $\rightarrow$  *Apoe*<sup>-/-</sup> and *Rcan1*<sup>+/+</sup>  $\rightarrow$  *Apoe*<sup>-/-</sup> mice showed no significant differences in the body weight gain or in the serum concentrations of triglyceride, total cholesterol, HDL or LDL (Fig S15 of Supporting Information). *En face* analysis of Oil Red O aorta staining revealed markedly smaller lesion area in mice lacking expression of Rcan1 in BM-derived cells (Fig 10A). Cross-sectional analysis by H&E staining indicated that lesion size in the aortic sinus and the intima/media ratio in the ascending aorta were significantly smaller in *Rcan1*<sup>-/-</sup>  $\rightarrow$  *Apoe*<sup>-/-</sup> mice than in *Rcan1*<sup>+/+</sup>  $\rightarrow$  *Apoe*<sup>-/-</sup> mice (Fig 10B-C). These data demonstrate that *Rcan1* expression in the haematopoietic cell compartment plays a major role in atherosclerosis progression.

#### DISCUSSION

Atherosclerosis is a complex disease involving lipid accumulation and the central participation of endothelial cells, VSMCs and monocyte-derived macrophages. Our results demonstrate that RCAN1 is induced in human and mouse atherosclerosis and strongly suggest that Rcan1 promotes disease progression. In addition, we have identified several mechanisms underlying Rcan1-dependent atherosclerosis development. In particular, we have shown that Rcan1 mediates CD36 expression, foam-cell formation and oxLDL-elicited inhibition of macrophage migration. Moreover, *Rcan1* ablation promotes expression of IL-10 and other anti-inflammatory markers, including *Mrc1*, in macrophages and lesions.

Rcan1 plays a critical role in vascular wall remodelling associated with aneurysm and neointima formation after angioplasty; and notably, BM transplantation experiments showed that haematopoietic-cell expression of Rcan1 is not required for aneurysm (Esteban et al, 2011). In contrast, our current findings show that Rcan1 expression in BM-cells is critical for atherogenesis. Our results do not however exclude a proatherogenic role of Rcan1 in VSMCs or endothelial cells. The eventual production of tissue-specific *Rcan1*-targeted mice will help to resolve this question. The different requirements for BM-cell expression of Rcan1 in atherosclerosis and aneurysm might be attributable to the pivotal role of Rcan1 in foam-cell formation, a central feature of atherosclerosis but not of aneurysm.

Although human and mouse atherosclerosis differ in several aspects, critical features are shared, and our results indicate that one such feature is RCAN1 induction. Moreover, we demonstrate that oxLDL, one of main stimuli of atherosclerosis, strongly induces Rcan1-4 not only in macrophages and VSMCs, but also in endothelial cells. Although most leukocytes in human and mouse atherosclerotic lesions are macrophages, plaques also contain lymphocytes, neutrophils and mast cells (Woollard & Geissmann, 2010). Whether Rcan1 is also induced in these cells remains to be determined.



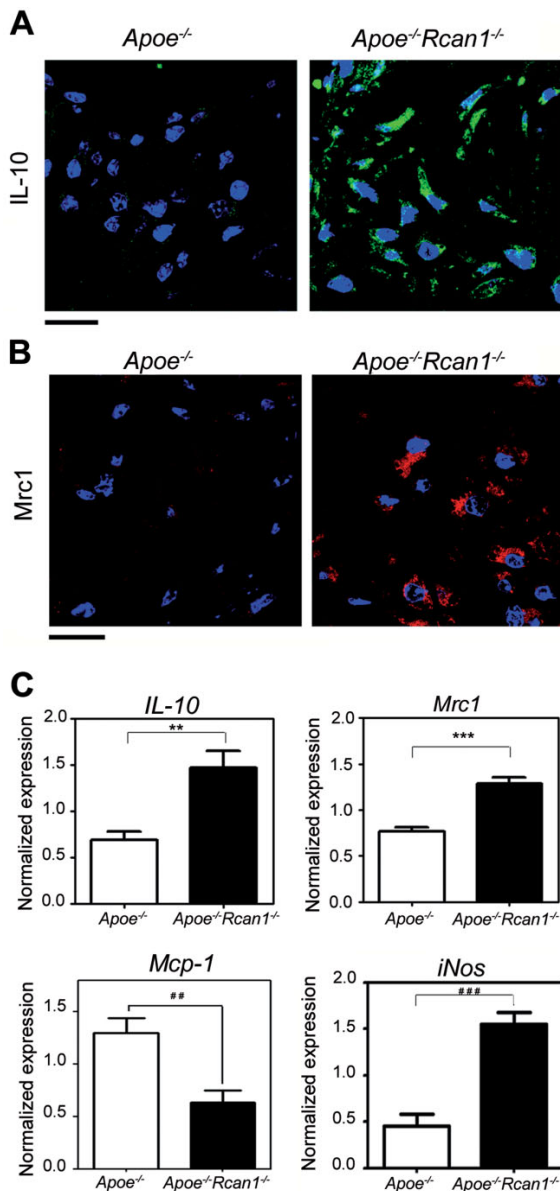
**Figure 8. Macrophage migration is inhibited by oxLDL in an Rcan1-dependent manner.**

- A.** Representative images of Hoechst-stained *Apoe*<sup>-/-</sup> and *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> macrophages, treated as indicated, on the lower filter surface of chemotaxis chambers (Bar, 100  $\mu$ m).
- B.** Quantification of migrated macrophages in 10 fields per condition. Data are shown relative to non-treated cells (mean  $\pm$  SEM,  $n = 4$ ; one-way ANOVA, \*\* $p = 0.002$ , \*\*\* $p < 0.00001$ ).
- C,D.** *Apoe*<sup>-/-</sup> and *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> macrophages were plated on serum-coated coverslips, incubated with oxLDL at 37°C and then photographed at the indicated times. (C) Representative photomicroscopy images are shown (Bar, 20  $\mu$ m) and (D) quantification of the spreading of these cells (mean  $\pm$  SEM,  $n = 3$ ; two-way ANOVA, \* $p = 0.019$ , \*\* $p = 0.002$ , \*\*\* $p = 0.003$ ).

Whereas RCAN1-1 is usually constitutive, RCAN1-4 expression is induced by several stimuli. Our data suggest that both RCAN1 isoforms might be upregulated in atherosclerotic lesions. However, only Rcan1-4 appears to be upregulated by atherogenic oxLDL in macrophages, endothelial cells and VSMCs. The presence of RCAN1-1 in lesions might indicate that *in vivo* this isoform is induced together with RCAN1-4 in

macrophages, endothelial cells or VSMCs. Alternatively, the high RCAN1-1 levels in lesions might reflect recruitment of other cell populations with constitutively high RCAN1-1 expression.

Our findings provide *in vivo* and *in vitro* evidence that Rcan1 is pro-atherogenic and that its genetic ablation deactivates several important pathological mechanisms. Rcan1 deficiency



**Figure 9. Increased expression of alternative macrophage polarization markers in *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> lesions and isolated macrophages.**

**A, B.** Representative immunofluorescence staining of (A) IL-10 and (B) *Mrc1* in aortic sinus lesions of *Apoe*<sup>-/-</sup> and *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> mice fed an HFD. Bars, 20 μm.

**C.** Quantitative PCR analysis of *IL-10*, *Mrc1*, *Mcp-1* and *iNos* mRNA expression in *Apoe*<sup>-/-</sup> and *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> peritoneal macrophages. mRNA amounts were normalized to *m36B4* expression (mean ± SEM; n = 3). Student's t-test, \*\*p = 0.0078, ###p = 0.0058, \*\*\*p = 0.0007, ####p = 0.0009.

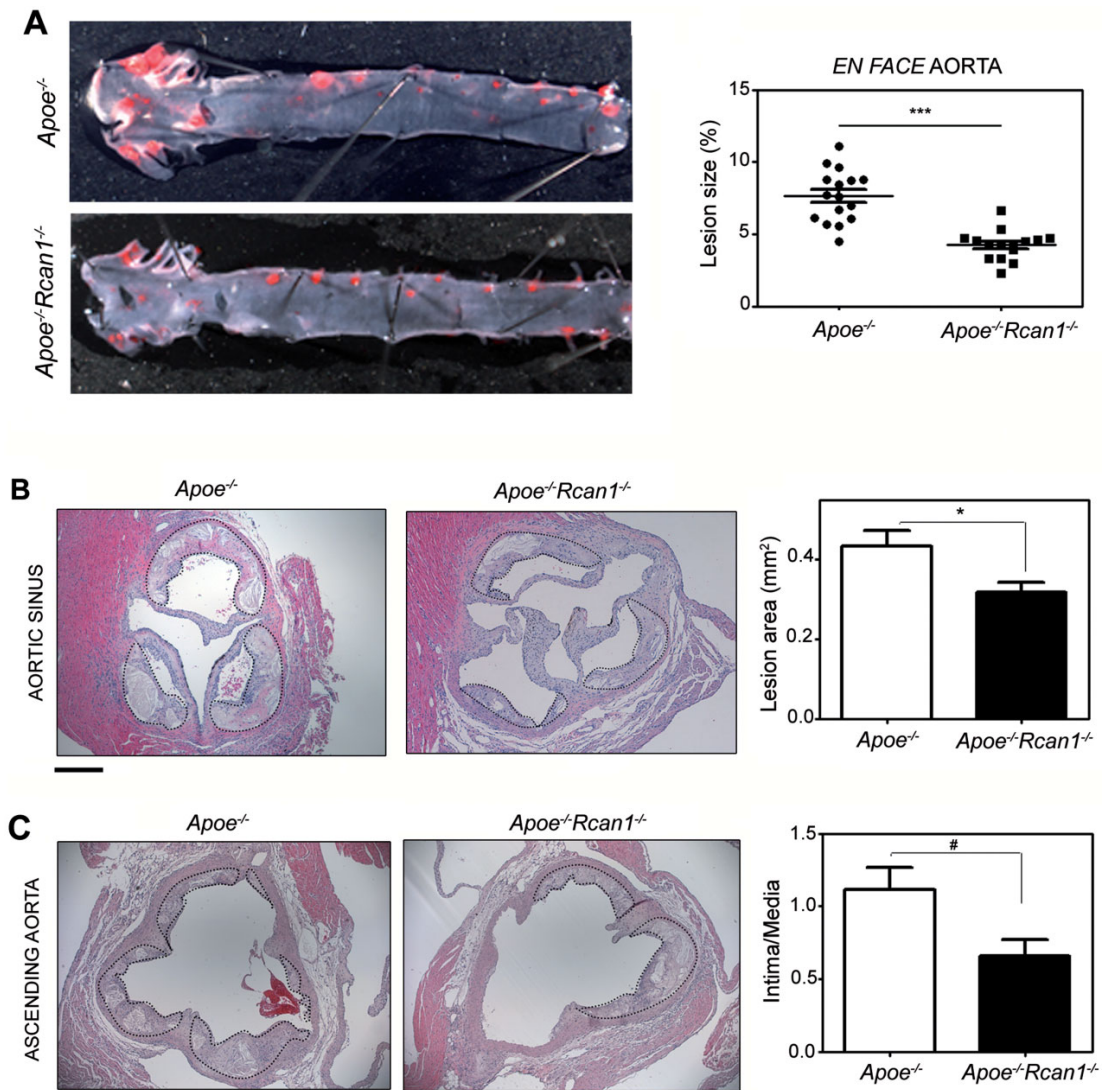
of early lesions (grade I) without showing any evidence of increased plaque instability.

The lower Oil Red O surface staining and the lower content of extracellular lipids in atherosclerotic lesions of *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> mice are consistent with the relatively low uptake of oxLDL by *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> macrophages. Interestingly, these macrophages have a similar capacity to engulf native LDL. Given that endocytic uptake of native LDL and oxLDL occurs via different receptors (Greaves & Gordon, 2009), our data suggest that *Rcan1* promotes the expression or activity of receptors specific for chemically modified forms of LDL. This conclusion is supported by our findings that CD36, a scavenger receptor involved in the uptake of modified forms of LDL and foam-cell formation (Febbraio et al, 2000), is downregulated in *Rcan1* deficient macrophages, while re-expression of *Rcan1*-1 and *Rcan1*-4 in these cells increased CD36 expression and foam-cell formation. Cholesterol efflux was weakly increased in *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> macrophages and the levels of the cellular transporters involved in this process were not significantly increased in these cells or in atherosclerotic lesions. Thus, the contribution of cholesterol efflux to *Rcan1*-mediated regulation of foam-cell formation remains uncertain.

The inflammatory nature of atherosclerotic disease is widely accepted. During the resolution of inflammation, macrophages egress from the inflamed site after engulfing pathogens, toxins or apoptotic cells. However, cholesterol-engorged macrophages fail to egress after clearing lipids and hence fail to resolve the inflammatory process (Angeli et al, 2004). Egress of macrophages from plaques is actively inhibited during hypercholesterolemia and this inhibition has been attributed, at least in part, to oxLDL loading into macrophages (Park et al, 2009). Our data suggest that *Rcan1* might facilitate the trapping of lipid-laden macrophages in atherosclerotic lesions by mediating oxLDL uptake, macrophage spreading and inhibition of their egress. Our data thus suggest that *Rcan1* might participate in a positive feedback loop in which *Rcan1*-mediated accumulation of oxLDL particles inhibits foam-cell egress from the plaque, resulting in increased exposure of the trapped foam cells to oxLDL and increased engulfment of these particles.

Most lesional macrophages in advanced plaques display a proinflammatory M1 phenotype, whereas alternatively activated M2 macrophages are more abundant in early lesions (Khallou-Laschet et al, 2010; Waldo et al, 2008). An additional macrophage subtype, whose gene expression program differs from that of M1 and M2 cells and which shows enhanced phagocytotic and chemotactic capacities, has also been reported

inhibits macrophage engulfment of oxLDL and hence foam-cell formation, and *Rcan1*<sup>-/-</sup> macrophages are resistant to oxLDL-mediated inhibition of migration towards chemotactic stimuli, a feature related to foam-cell egress from the plaque *in vivo*. Finally, in the absence of *Rcan1*, macrophages appear to acquire features of a predominantly anti-inflammatory phenotype. Consistent with this view, *Rcan1* inactivation in the *Apoe*-deficient mouse atherosclerosis model attenuates atherosclerotic lesion burden in terms both of lesion area and severity. While most lesions of *Apoe*<sup>-/-</sup> mice were advanced (grade IV), *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> mice exhibited a greater number



**Figure 10. Atherosclerosis requires Rcan1 expression in BM-derived cells.**

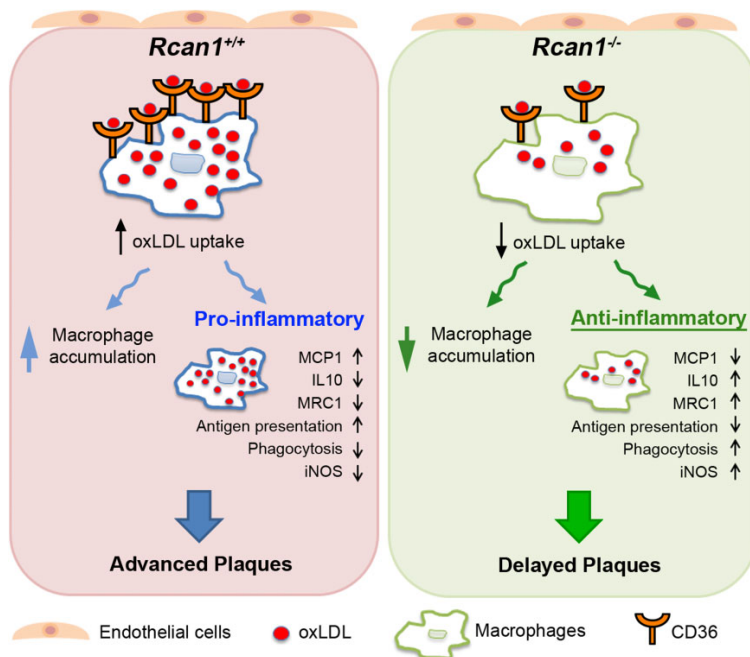
**A.** Representative Oil red O staining and quantification of the lesion area in the aortas of *Apoe*<sup>-/-</sup> mice transplanted with BM from *Apoe*<sup>-/-</sup> ( $n = 16$ ) or *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> ( $n = 15$ ) mice after 6 weeks on an HFD. Each data point denotes an individual mouse, and the horizontal bars denote the mean (long bar) and the SEM.

**B.** Representative H&E images and lesion area quantification in aortic sinus sections of these mice. Quantification is shown as mean  $\pm$  SEM ( $n = 13$ ). Bar, 200  $\mu$ m.

**C.** Representative H&E images and quantification of lesion measured as intima/media ratio. Data are means  $\pm$  SEM ( $n = 12$ ). Bar, 200  $\mu$ m. Student's *t*-test, \* $p = 0.02$ , # $p = 0.024$ , \*\*\* $p = 0.0001$ .

in advanced plaques (Kadl et al, 2010), and analysis of CD163 and CD206 (MRC1) distribution in human carotid plaque macrophages also suggested that there may be at least three macrophage phenotypes present in human plaques (Bouhlef et al, 2007). Our results show elevated expression of IL-10 and Mrc1 in lesions of Rcan1 deficient mice and no increase of *iNos*. Since IL-10 is a powerful anti-inflammatory cytokine and its

genetic ablation in mice promotes atherosclerotic lesion formation (Mallat et al, 1999), these results suggest that Rcan1 deficiency promotes the presence of macrophages with anti-inflammatory properties in the atheroma plaque, a conclusion consistent with the retarded progression of lesions in *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> mice. Whether these IL-10-producing cells are M2-like macrophages or an additional macrophage type



**Figure 11. Model depicting the contribution of Rcan1 to plaque formation.** Rcan1 mediates expression of the oxLDL receptor CD36 in macrophages, thus regulating oxLDL uptake. Low uptake of oxLDL by Rcan1-deficient macrophages results in macrophage polarization to a phenotype distinct from M1 or M2. These cells display numerous anti-inflammatory features, including high levels of IL10 and MRC1, low levels of MCP1, pronounced phagocytosis activity and weak antigen presentation (Ag pres). However, these macrophages also show increased iNOS expression. Rcan1 ablation also decreases macrophage accumulation, likely by preventing their entrapment and/or the MCP1-mediated recruitment of additional macrophages. The lower accumulation of macrophages in the plaque and their conversion into predominantly anti-inflammatory cells might account for the delayed plaque progression.

remains to be determined. Supporting an M2-like identity, *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> macrophages expressed high levels of *Mrc1* and *arginase-1* and low levels of *Mcp1*, and showed elevated phagocytic activity and a low antigen presentation capacity. However, M2 macrophages appear to take up oxLDL more efficiently than M1 cells (van Tits et al, 2011), whereas *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> macrophages engulfed less oxLDL than *Apoe*<sup>-/-</sup> cells. Together, our data suggest that Rcan1 deficiency promotes a macrophage polarization distinct from M1 and M2.

The precise molecular mechanism involved in Rcan1 regulation of oxLDL uptake, foam-cell trapping and macrophage polarization has yet to be identified. Rcan1 was first identified as a negative regulator of CN activity (Rothermel et al, 2000). However, additional studies indicated that Rcan1 can also activate CN (Kingsbury & Cunningham, 2000; Vega et al, 2003) and our previous studies showed that Rcan1 neither activates nor inhibits CN in aortic tissues or primary VSMC cultures (Esteban et al, 2011). Our present results show that the absence of Rcan1 has no significant effect on CN activity in unstimulated cells or lipopolysaccharide-stimulated macrophages (Fig S16 of Supporting Information). Rcan1 thus appears to promote atherosclerosis without interfering with CN activity, perhaps through its interaction with other Rcan1-interacting proteins implicated in gene activation, such as Raf-1 (Cho et al, 2005), 14-3-3 (Abbasi et al, 2006) and NF-κB-inducing kinase (Lee et al, 2008).

Our results show that RCAN1 is induced in human and mouse atherosclerotic vessels, and suggest that Rcan1 regulates CD36 expression and thus contributes to the uptake of pathogenic

forms of LDL cholesterol by macrophages in the plaque (Fig 11). The lower lipid uptake by Rcan1-deficient cells would attenuate their differentiation into pro-inflammatory macrophages and their accumulation in the plaque (Fig 11). Instead, expression by Rcan1-deficient macrophages of the anti-inflammatory cytokine IL-10 might inhibit further expansion of the plaque (Fig 11). These findings identify RCAN1 as an important regulator of atherosclerosis and strongly suggest that therapies aimed at inhibiting RCAN1 expression or function might significantly reduce atherosclerosis burden.

**MATERIALS AND METHODS**

An expanded Materials and Methods Section is available in the Supporting Information.

**Animal procedures**

Animal studies were in accordance with the guidelines of the EU on animal care and approved by the institutional ethics committee. Double-knockout *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> mice were previously described (Esteban et al, 2011). *Rcan1* targeting constitutively ablates the expression of both *Rcan1-1* and *Rcan1-4* in every cell (Porta et al, 2007). To accelerate atherosclerosis, 3-month-old mice were fed an HFD (10.8% total fat, 0.75% cholesterol) for 6 weeks. BM transplantation was performed as previously described (Esteban et al, 2011). After 4 weeks on chow diet, transplanted mice were placed on the HFD for 6 weeks. Plasma concentrations of free cholesterol, total cholesterol, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol and triglycerides were measured enzymatically.

## The paper explained

### PROBLEM:

Atherosclerosis, the underlying cause of myocardial infarction, stroke and peripheral vascular disease, is the major cause of morbidity and mortality in the developed world. It is a complex inflammatory disease characterized by accumulation of oxidized LDL (oxLDL) that triggers activation of the vascular endothelium and migration of monocytes into the lesion. These monocytes take up oxLDL and become lipid-laden foam cells that recruit smooth muscle cells and additional leukocytes. As RCAN1 is a signalling intermediate implicated in cell migration, we hypothesized that RCAN1 might contribute to atherosclerosis development.

### RESULTS:

We show that RCAN1 is induced in atherosclerotic human vessels and in the atherosclerotic arteries of a mouse model of atherosclerosis. Rcan1 is expressed *in vivo* in lesional macrophages, endothelial cells and vascular smooth muscle cells and was induced *in vitro* by treatment of these cells with oxLDLs.

Rcan1 genetic deletion reduced the extent and severity of atherosclerosis in mice, and this effect was mechanistically linked to diminished expression of the oxLDL receptor in macrophages (CD36), decreased oxLDL uptake, resistance to oxLDL-mediated inhibition of macrophage migration and a shift of macrophage polarization towards an anti-inflammatory phenotype. Importantly, transplantation of Rcan1-deficient bone-marrow-derived cells greatly inhibited atherosclerosis.

### IMPACT:

Our data define a major role for haematopoietic Rcan1 in atherosclerosis and suggest that Rcan1 might facilitate the trapping of lipid-laden macrophages in atherosclerotic lesions by upregulating CD36-mediated oxLDL uptake and thereby trapping proinflammatory macrophages in atherosclerotic lesions. Our findings strongly suggest that future therapies aimed at inhibiting RCAN1 expression or function might significantly reduce atherosclerosis burden.

### Human samples

Human coronary arteries and internal mammary arteries were collected from patients undergoing heart transplant and coronary artery bypass-graft surgery, respectively, at the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Barcelona, Spain). The studies were approved by the Ethics Committee and were conducted in accordance with the Helsinki Declaration.

### Histological analysis

Cross-sections (5- $\mu$ m) of paraffin-embedded or cryopreserved samples of mouse hearts and aortae were immunostained or evaluated by conventional Masson's Trichrome, H&E or Oil Red staining. Cross-sections were stained with antibodies and reagents specific for Rcan1, SMA, Mac3, Mrc1, IL-10, Ter-119 or endothelial cells and processed for either immunohistochemistry or immunofluorescence using standard procedures.

### Cell procedures

VSMCs were extracted from abdominal and thoracic aortas. Mouse lung endothelial cells were obtained from lung by selection with magnetic beads. Mouse peritoneal macrophages were collected by peritoneal lavage. Before stimulation, cells were rendered quiescent by culture in DMEM without FBS.

### Western blot analysis

Human specimens and mouse aorta samples for western blotting were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Protein extracts were obtained by tissue lysis in ice-cold lysis buffer, separated under reducing conditions on SDS-polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose membranes. Proteins were detected with anti-Rcan1, anti-Gsk3- $\beta$ , anti- $\alpha$ -actin, anti-

alpha-tubulin, anti-PSF primary antibodies and HRP-conjugated secondary antibodies. Immunocomplexes were detected by chemiluminescence.

### Atherosclerotic lesion analysis

Hearts from euthanized mice were perfused through the left ventricle with PBS. After fixing in 4% paraformaldehyde overnight at  $4^{\circ}$ , the aortas were thoroughly cleaned to remove all adventitial fat and connective tissue. Aortas were whole-mount stained with 0.2% Oil Red O in 80% methanol, opened longitudinally and pinned to black wax to expose the entire luminal surface. Images were acquired and the area of atherosclerotic plaques was measured using ImageJ software.

### Migration assays

Migration of peritoneal macrophages was measured in a modified Boyden chamber using Transwell inserts with a 5  $\mu$ m-pore membrane. Cells ( $1-2 \times 10^5$  per well) in AlphaMEM supplemented with 0.1% BSA were loaded into the migration chamber with 50  $\mu$ g/ml of lipoprotein (LDL, oxLDL or acLDL). The number of migrated cells was counted on fluorescence microscopy photographs of 10 randomly selected fields.

For wound healing assays, a single scrape wound was made on peritoneal macrophage monolayers. After washing with PBS, cells were incubated with 2% FBS plus 100 ng/ml MCP-1 with or without 50  $\mu$ g/ml oxLDL. Macrophage motility was monitored by time-lapse video-microscopy. The number of cells that migrated into the denuded area was counted using ImageJ.

### Spreading assays

Peritoneal macrophages were placed on serum-coated slides and allowed to attach. After stimulation with 50  $\mu$ g/ml oxLDL, macrophages were fixed in 4% paraformaldehyde and stained with

fluorescein-conjugated phalloidin. Cell perimeter and surface area were measured to determine cell spreading according to the formula  $\text{Spreading} = \text{perimeter}^2 / (4 \times \pi \times \text{area})$ .

#### Foam-cell formation

Peritoneal macrophages were plated on coverslips, incubated with 50 µg/ml LDL or oxLDL for 24 h, fixed in 4% paraformaldehyde and stained with Oil red O and counterstained with haematoxylin.

#### Laurdan GP microscopy

Laurdan GP microscopy has been described previously (Bagatolli et al, 2003; Sanchez et al, 2007). Peritoneal macrophages were cultured in the presence of 1 µM Laurdan in serum-free medium. Laurdan fluorescence was excited with a mode-locked titanium-sapphire laser set at 780 nm and its emission collected at 445–465 nm and 474–514 nm. GP images were obtained with an ALBA microscope equipped with a 63× water objective and analysed using ImageJ software.

#### Quantitative PCR

Real-time quantitative RT-PCR was performed using a Prime Time qPCR assay specific for human *GAPDH* and TaqMan Gene Expression assays specific for human *RCAN1-1*, *RCAN1-4* and mouse *Rcan1* and *Hprt1*. SYBR Green was used for RT-PCR detection of mouse *CD-36*, *SR-A*, *ABCA*, *ABCG*, *IL-10*, *Mrc1*, *Arg1*, *Mcp-1*, *iNos* and *m36B4*. Calculations were made from measurements of 3 replicates of each sample. The amount of target mRNA in samples was estimated by the 2CT relative quantification method using *GAPDH*, *m36B4* or *Hprt1* for normalization.

#### Statistical analysis

All values are expressed as means ± SEM. Differences were evaluated using one-way or two-way analysis of variance (ANOVA) and Bonferroni's *post hoc* test (experiments with ≥3 groups) or the Student's *t*-test, as appropriate for the data. Statistical significance was assigned at  $p < 0.05$ .

#### Author contributions

The study was conceived by JMR and MRC. NMB, VE, JMR and MRC designed the study and analysed the data. NMB and VE performed most of the experiments with contributions from SV, AE, KU and AA. CR and JMG assessed RCAN1 expression in human samples. SAS performed Laurdan GP microscopy and analysed the data obtained. VA, TO and TM provided experimental support and ideas for the project. JMR and MRC wrote the manuscript with contributions of NMB, SAS and JMG. All authors read and approved the manuscript.

#### Acknowledgements

We thank Dr. S. de la Luna for kindly providing pHA-CALP1L and pHA-CALPIS plasmids, Dr. S. Bartlett for English editing and R. Alberca for technical support. The Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (Ministerio de Economía y Competitividad) supports MRC, JMR and JM-G with grants

SAF2010-15126, SAF2009-10708 and SAF2012-40127, respectively; MRC is also supported by the Spanish Council for Scientific Research (CSIC); JMR is also supported by Fundación La Marató TV3 (080731), and Fundación Genoma España (GENOMA). The Red de Investigación Cardiovascular (RIC) of the Spanish Ministry of Health (Ministerio de Sanidad) supports the research of JMR, VA and JM-G with grants RD12/0042/0022, RD12/0042/0028 and RD12/0042/0053, respectively. The Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC) is supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness and the Pro-CNIC Foundation. TM was supported in part by the Leading-edge Research Promotion Fund (LS038, TM). VE was an investigator of the Sara Borrell Program (CD06/00232), and NM-B holds an FPU fellowship (FPU2008-1500).

Supporting Information is available at EMBO Molecular Medicine Online.

The authors declare that they have no conflict of interest.

#### References

- Abbasi S, Lee JD, Su B, Chen X, Alcon JL, Yang J, Kellems RE, Xia Y (2006) Protein kinase-mediated regulation of calcineurin through the phosphorylation of modulatory calcineurin-interacting protein 1. *J Biol Chem* 281: 7717-7726
- Angeli V, Llodra J, Rong JX, Satoh K, Ishii S, Shimizu T, Fisher EA, Randolph GJ (2004) Dyslipidemia associated with atherosclerotic disease systemically alters dendritic cell mobilization. *Immunity* 21: 561-574
- Baek KH, Zaslavsky A, Lynch RC, Britt C, Okada Y, Siarey RJ, Lensch MW, Park IH, Yoon SS, Minami T et al (2009) Down's syndrome suppression of tumour growth and the role of the calcineurin inhibitor DSCR1. *Nature* 459: 1126-1130
- Bagatolli LA, Sanchez SA, Hazlett T, Gratton E (2003) Giant vesicles, Laurdan, and two-photon fluorescence microscopy: Evidence of lipid lateral separation in bilayers. *Methods Enzymol* 360: 481-500
- Bouhlel MA, Derudas B, Rigamonti E, Dievart R, Brozek J, Haulon S, Zawadzki C, Jude B, Torpier G, Marx N et al (2007) PPARγ activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. *Cell Metab* 6: 137-143
- Cano E, Canellada A, Minami T, Iglesias T, Redondo JM (2005) Depolarization of neural cells induces transcription of the Down syndrome critical region 1 isoform 4 via a calcineurin/nuclear factor of activated T cells-dependent pathway. *J Biol Chem* 280: 29435-29443
- Chase AJ, Bond M, Crook MF, Newby AC (2002) Role of nuclear factor-κB activation in metalloproteinase-1, -3, and -9 secretion by human macrophages in vitro and rabbit foam cells produced in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22: 765-771
- Cho YJ, Abe M, Kim SY, Sato Y (2005) Raf-1 is a binding partner of DSCR1. *Arch Biochem Biophys* 439: 121-128
- Crawford DR, Leahy KP, Abramova N, Lan L, Wang Y, Davies KJ (1997) Hamster adapt78 mRNA is a Down syndrome critical region homologue that is inducible by oxidative stress. *Arch Biochem Biophys* 342: 6-12
- Davies KJ, Ermak G, Rothermel BA, Pritchard M, Heitman J, Ahnn J, Henriques-Silva F, Crawford D, Canaider S, Strippoli P et al (2007) Renaming the DSCR1/Adapt78 gene family as RCAN: Regulators of calcineurin. *FASEB J* 21: 3023-3028
- Ermak G, Harris CD, Battocchio D, Davies KJ (2006) RCAN1 (DSCR1 or Adapt78) stimulates expression of GSK-3β. *FEBS J* 273: 2100-2109
- Ermak G, Harris CD, Davies KJ (2002) The DSCR1 (Adapt78) isoform 1 protein calcipressin 1 inhibits calcineurin and protects against acute calcium-mediated stress damage, including transient oxidative stress. *FASEB J* 16: 814-824

## Research Article

RCAN1 mediates atherosclerosis

www.embomolmed.org

- Espinosa AV, Shinohara M, Porchia LM, Chung YJ, McCarty S, Saji M, Ringel MD (2009) Regulator of calcineurin 1 modulates cancer cell migration in vitro. *Clin Exp Metastasis* 26: 517-526
- Esteban V, Mendez-Barbero N, Jimenez-Borreguero LJ, Roque M, Novensa L, Garcia-Redondo AB, Saldañas M, Vila L, Arbones ML, Campanero MR *et al* (2011) Regulator of calcineurin 1 mediates pathological vascular wall remodeling. *J Exp Med* 208: 2125-2139
- Febbraio M, Podrez EA, Smith JD, Hajjar DP, Hazen SL, Hoff HF, Sharma K, Silverstein RL (2000) Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. *J Clin Invest* 105: 1049-1056
- Ferretti G, Rabini RA, Bacchetti T, Vignini A, Salvolini E, Ravaglia F, Curatola G, Mazzanti L (2002) Glycated low density lipoproteins modify platelet properties: A compositional and functional study. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 2180-2184
- Fuentes JJ, Pritchard MA, Estivill X (1997) Genomic organization, alternative splicing, and expression patterns of the DSCR1 (Down syndrome candidate region 1) gene. *Genomics* 44: 358-361
- Getz GS, Reardon CA (2012) Animal models of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32: 1104-1115
- Gordon S, Taylor PR (2005) Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 5: 953-964
- Greaves DR, Gordon S (2009) The macrophage scavenger receptor at 30 years of age: Current knowledge and future challenges. *J Lipid Res* 50: S282-286
- Hansson GK, Hermansson A (2011) The immune system in atherosclerosis. *Nat Immunol* 12: 204-212
- Harris CD, Ermak G, Davies KJ (2005) Multiple roles of the DSCR1 (Adapt78 or RCAN1) gene and its protein product calcipressin 1 (or RCAN1) in disease. *Cell Mol Life Sci* 62: 2477-2486
- Hoeffler CA, Dey A, Sachan N, Wong H, Patterson RJ, Shelton JM, Richardson JA, Klann E, Rothermel BA (2007) The Down syndrome critical region protein RCAN1 regulates long-term potentiation and memory via inhibition of phosphatase signaling. *J Neurosci* 27: 13161-13172
- Iizuka M, Abe M, Shiiba K, Sasaki I, Sato Y (2004) Down syndrome candidate region 1, a downstream target of VEGF, participates in endothelial cell migration and angiogenesis. *J Vasc Res* 41: 334-344
- Kadl A, Meher AK, Sharma PR, Lee MY, Doran AC, Johnstone SR, Elliott MR, Gruber F, Han J, Chen W *et al* (2010) Identification of a novel macrophage phenotype that develops in response to atherogenic phospholipids via Nrf2. *Circ Res* 107: 737-746
- Khallou-Laschet J, Varthaman A, Fornasa G, Compain C, Gaston AT, Clement M, Dussiot M, Levillain O, Graff-Dubois S, Nicoletti A *et al* (2010) Macrophage plasticity in experimental atherosclerosis. *PLoS One* 5: e8852
- Kingsbury TJ, Cunningham KW (2000) A conserved family of calcineurin regulators. *Genes Dev* 14: 1595-1604
- Lapid K, Itkin T, D'Uva G, Ovadya Y, Ludin A, Caglio G, Kalinkovich A, Golan K, Porat Z, Zollo M *et al* (2013) GSK3beta regulates physiological migration of stem/progenitor cells via cytoskeletal rearrangement. *J Clin Invest* 123: 1705-1717
- Lee EJ, Seo SR, Um JW, Park J, Oh Y, Chung KC (2008) NF-kappaB-inducing kinase phosphorylates and blocks the degradation of Down syndrome candidate region 1. *J Biol Chem* 283: 3392-3400
- Libby P (2002) Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420: 868-874
- Mallat Z, Besnard S, Duriez M, Deleuze V, Emmanuel F, Bureau MF, Soubrier F, Esposito B, Duez H, Fievet C *et al* (1999) Protective role of interleukin-10 in atherosclerosis. *Circ Res* 85: e17-24
- Minami T, Horiuchi K, Miura M, Abid MR, Takabe W, Noguchi N, Kohro T, Ge X, Aburatani H, Hamakubo T *et al* (2004) Vascular endothelial growth factor- and thrombin-induced termination factor, Down syndrome critical region-1, attenuates endothelial cell proliferation and angiogenesis. *J Biol Chem* 279: 50537-50554
- Mosser DM, Edwards JP (2008) Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8: 958-969
- Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross R (1994) ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb* 14: 133-140
- Park YM, Febbraio M, Silverstein RL (2009) CD36 modulates migration of mouse and human macrophages in response to oxidized LDL and may contribute to macrophage trapping in the arterial intima. *J Clin Invest* 119: 136-145
- Plump AS, Smith JD, Hayek T, Aalto-Setälä K, Walsh A, Verstuyft JG, Rubin EM, Breslow JL (1992) Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell* 71: 343-353
- Porta S, Serra SA, Huch M, Valverde MA, Llorens F, Estivill X, Arbones ML, Martí E (2007) RCAN1 (DSCR1) increases neuronal susceptibility to oxidative stress: A potential pathogenic process in neurodegeneration. *Hum Mol Genet* 16: 1039-1050
- Randolph GJ (2008) Emigration of monocyte-derived cells to lymph nodes during resolution of inflammation and its failure in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 19: 462-468
- Rothermel B, Vega RB, Yang J, Wu H, Bassel-Duby R, Williams RS (2000) A protein encoded within the Down syndrome critical region is enriched in striated muscles and inhibits calcineurin signaling. *J Biol Chem* 275: 8719-8725
- Ryeom S, Baek KH, Rieth MJ, Lynch RC, Zaslavsky A, Birsnier A, Yoon SS, McKeon F (2008) Targeted deletion of the calcineurin inhibitor DSCR1 suppresses tumor growth. *Cancer Cell* 13: 420-431
- Sanchez SA, Tricerri MA, Gunther G, Gratton E (2007) Laurdan generalized polarization: From cuvette to microscope. In *Modern Research and Educational Topics in Microscopy: Applications in Physical/Chemical Sciences*, Mendez-Vilas A, Diaz J (eds), pp 1007-1014. Badajoz, Spain: Formatex
- Sanchez S, Tricerri MA, Ossato G, Gratton E (2010) Lipid packing determines protein-membrane interactions: Challenges for apolipoprotein A-I and high density lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* 1798: 1399-1408
- Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W, Jr., Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW (1994) A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb* 14: 840-856
- Stossel TP (1994) The machinery of cell crawling. *Sci Am* 271: 54-55, 58-63
- Strippoli P, Petrini M, Lenzi L, Carinci P, Zannotti M (2000) The murine DSCR1-like (Down syndrome candidate region 1) gene family: Conserved synteny with the human orthologous genes. *Gene* 257: 223-232
- Suzuki H, Kurihara Y, Takeya M, Kamada N, Kataoka M, Jishage K, Ueda O, Sakaguchi H, Higashi T, Suzuki T *et al* (1997) A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature* 386: 292-296
- van Tits LJ, Stienstra R, van Lent PL, Netea MG, Joosten LA, Stalenhoef AF (2011) Oxidized LDL enhances pro-inflammatory responses of alternatively activated M2 macrophages: A crucial role for Kruppel-like factor 2. *Atherosclerosis* 214: 345-349
- Vega RB, Rothermel BA, Weinheimer CJ, Kovacs A, Naseem RH, Bassel-Duby R, Williams RS, Olson EN (2003) Dual roles of modulatory calcineurin-interacting protein 1 in cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 669-674
- Waldo SW, Li Y, Buono C, Zhao B, Billings EM, Chang J, Kruth HS (2008) Heterogeneity of human macrophages in culture and in atherosclerotic plaques. *Am J Pathol* 172: 1112-1126
- Wang Y, De Keulenaer GW, Weinberg EO, Muangman S, Gualberto A, Landschulz KT, Turi TG, Thompson JF, Lee RT (2002) Direct biomechanical induction of endogenous calcineurin inhibitor Down Syndrome Critical Region-1 in cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H533-539

Woollard KJ, Geissmann F (2010) Monocytes in atherosclerosis: Subsets and functions. *Nat Rev Cardiol* 7: 77-86

Yang J, Rothermel B, Vega RB, Frey N, McKinsey TA, Olson EN, Bassel-Duby R, Williams RS (2000) Independent signals control expression of the calcineurin inhibitory proteins MCIP1 and MCIP2 in striated muscles. *Circ Res* 87: E61-68

Yang YJ, Chen W, Edgar A, Li B, Molkenin JD, Berman JN, Lin TJ (2009) Rcan1 negatively regulates Fc epsilonRI-mediated signaling and mast cell function. *J Exp Med* 206: 195-207

Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N (1992) Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science* 258: 468-471



## SUPPORTING INFORMATION

### Table of contents

Detailed Materials and Methods	Pages 1 - 9
Supporting Information References	Page 10
Supporting Information Figures	Pages 11 - 24

## DETAILED MATERIALS AND METHODS

### Animal procedures

Animal studies were approved by the local ethics committee, and all animal procedures conformed to EU Directive 2010/63EU and Recommendation 2007/526/EC regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes, enforced in Spanish law under Real Decreto 1201/2005. C57BL/6J and *Apoe*<sup>-/-</sup> mice were obtained from Charles Rivers (JAX mice stock # 000664 and 002052, respectively). *Rcan1*<sup>-/-</sup> mice (mixed C57BL/6 and 129P2/OlaHsd background)(Porta et al, 2007), in which both *Rcan1-1* and *Rcan1-4* are targeted simultaneously, were backcrossed through >6 generations on a C57BL/6J background (Esteban et al, 2011) and subsequently crossed with *Apoe*<sup>-/-</sup> mice to create double-knockout *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> mice (Esteban et al, 2011). All mice were genotyped by PCR of tail samples. To accelerate atherosclerosis, 3-month-old mice were fed a HFD (10.8% total fat, 0.75% cholesterol; S4892-E010, Ssniff, Germany) for 6 wks. All experiments compared *Apoe*<sup>-/-</sup> mice to *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> littermates.

BM transplantation was performed as previously described (Esteban et al, 2011). Briefly, 2-month-old *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>+/+</sup> mice were lethally irradiated (9 Gy) and transplanted through the tail vein with BM-derived cells (10<sup>7</sup>) obtained from tibias and femurs of euthanized donor *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> or *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>+/+</sup> mice. After 4 wk on chow diet, transplanted mice were placed on the HFD for 6 wk.

Whole blood was extracted postmortem by cardiac puncture and serum was obtained. Plasma concentrations of free cholesterol, total cholesterol, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol and triglycerides were measured enzymatically using Kinetic colorimetric kits (Spinreact; Spain).

Circulating blood cells and platelets were counted and identified using a Petra Multi Link automated cell counter (Horiba). To count subpopulations of lymphocytes, erythrocytes were lysed in peripheral blood with red blood cell lysis buffer (1.5 M ammonium chloride, 0.1 M potassium bicarbonate, 0.1 M EDTA) for 3 min on ice. The reaction was stopped with PBS 1% BSA and cells were incubated with CD45 PerCP-Cy5.5 (BD Pharmingen 550994), B220 Biotin (BD Pharmingen 559971), CD3 AlexaFluor488 (BD Pharmingen 557666), CD4 Pe (BD Pharmingen 553653) and CD8 AlexaFluor647 (BD Pharmingen 557682) for 30 min on ice. Streptavidin 405 (Invitrogen, S-32351) was used as secondary antibody. Cells were counted by flow cytometry using a BDFACS Canto II flow cytometer (BD Biosciences) and data were analyzed FlowJo software (Tree Star).

### **Human samples**

Human coronary arteries and internal mammary arteries were collected from patients undergoing heart transplant and coronary artery bypass-graft surgery, respectively, at the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Barcelona, Spain). Atherosclerotic and non-atherosclerotic coronary arteries were from coronary artery disease (CAD) and non-CAD patients, respectively. The studies were approved by the Ethics Committee and were conducted in accordance with the Helsinki Declaration.

### **Histological analysis and immunostaining**

Mouse hearts and aortas were perfused with PBS, removed, fixed in 4% paraformaldehyde for 24 h, embedded in paraffin and prepared in 5- $\mu$ m transverse sections for immunostaining or staining with H&E or Masson's Trichrome. Alternatively, mouse hearts were fixed in 10% paraformaldehyde for 24 h at 4°C, incubated 24h in PBS supplemented with 30% sucrose and embedded in OCT and cryopreserved at -70°C. Cryocut cross-sections (5  $\mu$ m) of heart tissue were then prepared.

Deparaffinized sections were rehydrated and antigens retrieved in 10 mM citrate buffer pH 6.0 (95°C, 20 min). Samples were blocked for 30 min with either 10% goat serum or 10% horse serum (for immunohistochemistry) or with 10% horse serum plus 2% BSA (for immunofluorescence), all in PBS. Cryocut cross-sections were stained with Oil Red (0.5% in isopropanol) or Masson's thricrome stain. Paraffin cross-sections were stained with hematoxilin-eosin or Masson's thricrome stain or were processed for immunohistochemistry or immunofluorescence. Samples were stained with rabbit anti-Rcan1 (D6694; Sigma-

Aldrich), alkaline phosphatase-conjugated mouse anti-smooth muscle actin (SMA) (A5691; Sigma-Aldrich), mouse anti-Mac3 (sc-1991; Santa Cruz Biotechnology), biotinylated lectin (L2140, Sigma-Aldrich), anti-Mrc1 (MCA2235GA; Serotec), anti-Ter119 (553672; BD), and biotinylated anti-IL-10 (Diacclone). For Rcan1 and Mac3 immunohistochemistry, color was developed with DAB (Vector Laboratories) and sections were then counterstained with hematoxylin, dehydrated, and mounted in DPX (Fluka). For SMA, color was developed with Fast-Red Alkaline Phosphatase Substrate Tablets (Sigma-Aldrich).

Images were acquired at RT using a Leica DM2500 microscope with 10x, 20x or 40x HCX PL Fluotar objective lenses and Leica Application Suite V3.5.0 acquisition software. Secondary antibodies for immunofluorescence were Alexa Fluor Cy3-conjugated goat anti-rabbit (excitation at 555 nm, emission at 500-610 nm), Alexa Fluor 488-conjugated chicken anti-mouse (excitation at 488 nm, emission at 505-600 nm), Alexa Fluor 647 chicken anti-rat (Invitrogen; excitation at 633 nm, emission at LP640 and pseudocolored in red) and streptavidin-Alexa Fluor 647 (Invitrogen; excitation at 633 nm, emission at LP640 and pseudocolored in green). Nuclei were stained with DAPI (excitation at 405 nm, emission at 420-475 nm). Immunofluorescence stainings were mounted in Citifluor AF4 mounting medium (Aname) and images (1024 x 1024 pixels; 8-bit) were acquired at RT using an inverted confocal microscope (LSM700; Carl Zeiss) with 63x Plan-Apochromat oil immersion objectives. Images were analyzed using ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>) or MetaMorf (Molecular Devices; Sunnyvale, California) and were processed for presentation with Zen 2009 Light Edition (Carl Zeiss) and Adobe Photoshop.

### **Cell procedures**

VSMCs were extracted from abdominal and thoracic aortas as described (Esteban et al, 2011) and cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, GIBCO-Invitrogen) containing 10% fetal bovine serum (FBS; Lonza), L-glutamine and antibiotics (100 units/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin). Mouse lung endothelial cells (MLECs) were obtained from mouse lungs digested with 0.2% collagenase P (Roche) for 1 h at 37°C, and further disaggregated to produce single-cell suspensions. The mixed population obtained was subjected to negative selection with magnetic beads (Dyna) coated with anti-CD16 (BD Biosciences) followed by positive selection with magnetic beads coated with anti-ICAM-2 (BD Biosciences). This procedure resulted in a >90% pure population of endothelial cells.

MLECs were grown on 0.5% gelatin, 100mg/ml collagen I (Sigma) in DMEM F-12 (Biomluter BE. 12-719F) containing 20% FBS, heparin (100mg/ml), EGCF (5mg/ml), glutamine (Sigma), and antibiotics (100 units/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin). Before stimulation, cells were rendered quiescent by 48 h culture in DMEM without FBS (VSMCs) or overnight culture with 0.5% FBS (MLECs).

Peritoneal macrophages were collected from mice by peritoneal lavage 4 days after intraperitoneal injection of 3% (wt/vol) thioglycolate. Cells were used for migration experiments or were cultured 24-48 h in AlphaMEM (Lonza) supplemented with 10% FBS, L-glutamine and antibiotics and stimulated for 4-24 h in medium containing 2% FBS and 50µg/ml LDL (Invitrogen) or 50µg/ml oxLDL (Biomedical Technologies).

#### **Flow cytometry.**

Peritoneal macrophages were cultured for 72h and then suspended in PBS containing 1% BSA, pre-incubated with Mouse BD Fc Block (BD Pharmingen, 553141) and costained for 30 min at 4°C with anti-Mouse F4/80 Antigen PE-Cyanine7 (eBioscience, 25-4801-82) and rabbit anti-CD36 (Abcam, ab78054) or anti-SR-A (Santa Cruz, sc-20444). Alexa Fluor 647-conjugated goat anti-rabbit (Invitrogen, A-21443) and Alexa Fluor 647-conjugated chicken anti-goat (Invitrogen, A-21469) were used as secondary antibodies. Cells were counted by flow cytometry using a BD FACS Canto II flow cytometer (BD Biosciences) and data were analyzed with FlowJo software (Tree Star).

#### **Western blot analysis**

Human specimens and mouse aortic samples for western blotting were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Human protein extracts 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) (Fuster et al, 2011). Mouse tissue protein extracts were obtained using ice-cold lysis buffer containing 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 150 mM NaCl and 5mM EDTA, supplemented with 1 µM dithiothreitol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 100 µM benzamide, 1 µg/ml pepstatin and 1µg/ml aprotinin.

After stimulation of primary cultures, cells were washed with ice-cold PBS and lysed with 20 mM Hepes pH 7.6 containing 1% Triton X-100, 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA, 3 mM EGTA, 1  $\mu$ M dithiothreitol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 100  $\mu$ M benzamidine, 1  $\mu$ g/ml pepstatin and 1 $\mu$ g/ml aprotinin.

Proteins were separated under reducing conditions on SDS-polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose membranes. Protein detection was performed with anti-Rcan1 (D6694; Sigma-Aldrich), anti- $\alpha$ -actin (M0851, Dako), anti-Gsk3 $\beta$  (9315; Cell Signaling), anti-PSF (P2860; Sigma-Aldrich) anti-alpha-tubulin (T6074; Sigma-Aldrich) and HRP-conjugated secondary antibodies (Pierce). Immunocomplexes were detected with enhanced chemiluminescence (ECL) detection reagent (Millipore).

### **Atherosclerotic lesion analysis**

Hearts from euthanized mice were perfused through the left ventricle with PBS. After fixing in 4% paraformaldehyde overnight at 4 $^{\circ}$ , the aortas were thoroughly cleaned under a dissecting microscope to remove all adventitial fat and connective tissue. Aortas were whole-mount stained with 0.2% Oil Red O (Sigma O0625) in 80% methanol, opened longitudinally and pinned to black wax to expose the entire luminal surface. Images were acquired using an Olympus SZX10 stereomicroscope (Olympus, Germany) coupled to an Olympus UC30 digital color camera (Olympus, Germany). The planimetric area of atherosclerotic plaques was measured in pixels using ImageJ and converted to mm $^2$ .

### **Migration assays**

Migration of peritoneal macrophages was measured in a modified Boyden chamber using Transwell inserts with a 5  $\mu$ m-pore membrane (Costar). Medium containing 2% FBS and 100ng/ml MCP-1 (RD Systems) was placed in the lower wells in some cases. Cells (1-2 x 10 $^5$  per well) in AlphaMEM supplemented with 0.1% BSA were loaded into the migration chamber with 50 $\mu$ g/ml of lipoprotein, (LDL, oxLDL or acLDL). After allowing cell migration for 18 h, cells were removed from the upper side of membranes, and nuclei of migrated cells on the lower side of the membrane were stained with Hoechst. The number of migrated cells was counted on fluorescence microscopy photographs of 10 randomly-selected fields. Experiments were performed in triplicate.

For wound healing assays, a single scrape wound was made on monolayers of peritoneal macrophages seeded 3 days before on 35-mm-diameter plates. After washing with PBS, cells were incubated with 2% FBS plus 100ng/ml MCP-1 with or without 50µg/ml oxLDL. The number of cells that migrated into the denuded area was counted using ImageJ. Macrophage motility was monitored by time-lapse videomicroscopy.

### Spreading assays

Peritoneal macrophages ( $10^4$  cells) were placed on serum-coated slides and allowed to attach to the surface at 37°C for 20 minutes. After stimulation of macrophages with 50µg/ml oxLDL for the indicated times, cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 15 minutes and stained with fluorescein-conjugated phalloidin. Images were taken using an inverted confocal microscope (LSM700; Carl Zeiss) fitted with a 63x Plan-Apochromat oil immersion objective. Cell perimeter and surface was measured with cell profile software and spreading was determined according to the formula  $\text{Spreading} = \text{perimeter}^2 / (4 \times \pi \times \text{area})$ .

### Foam-cell formation.

Peritoneal macrophages were plated on coverslips, incubated with 50µg/ml LDL or oxLDL for 24h, fixed in 4% paraformaldehyde for 15 minutes and stained with Oil red O and counterstained with hematoxylin.

### Laurdan GP microscopy.

Laurdan GP microscopy has been described previously (Bagatolli et al, 2003; Sanchez et al, 2007). Peritoneal macrophages were cultured in the presence of 1 µM Laurdan (Molecular Probes, Grand Island, NY) for 30 minutes in serum-free medium, using DMSO as vehicle. Laurdan fluorescence was excited with a mode-locked titanium-sapphire laser (Spectra-Physics Mai Tai DS) set at 780 nm and its emission collected at 445-465 nm and 474-514 nm. GP images (512x512, 32 bits) were obtained with an ALBA microscope (ISS, Illinois) equipped with a 63x water objective (1.2 NA) and analyzed using Image-J software (NIH Image, National Institute of Health, Bethesda, MD). Laurdan GP was calculated by using a G factor of DMSO-dissolved Laurdan = 0.57 (Bagatolli et al, 2003) and applying the following equation to every pixel:

$$\text{Laurdan GP} = \frac{I_{(425-465\text{nm})} - G \times I_{(476-514\text{nm})}}{I_{(425-465\text{nm})} + G \times I_{(476-514\text{nm})}}$$

where  $I_{425-465}$  and  $I_{476-514}$  are the emission intensities at 445-465 and 474-514 nm respectively.

### **Cholesterol accumulation and efflux**

Peritoneal macrophages were plated at  $5 \times 10^5$  cells/well in 24-well plates. After 24 h, triplicate wells were cultured in Alpha MEM with 10% human lipoprotein deficient serum, in the presence of 2  $\mu$ Ci/ml of  $^3$ H-cholesterol (Perkin Elmer) and 50  $\mu$ g/ml of acLDL (Biomedical Technologies) for 24h (cholesterol accumulation) or 32h (cholesterol efflux).  $^3$ H-cholesterol accumulation was measured by scintillation counting after extraction of cellular lipids with hexane/isopropanol (2:1). For efflux assessment, cells were extensively washed in PBS, and then incubated in Alpha-MEM plus either 100  $\mu$ g/ml HDL (Biomedical Technologies) or 0.1 % BSA for 24 h. Radioactivity was measured by scintillation counting in the medium and in cellular lipids after extraction with hexane/isopropanol (2:1). HDL-induced cholesterol efflux was calculated using the following equation:

$$\% \text{ efflux} = \left( \frac{\text{cpm in medium}}{\text{cpm in medium} + \text{cpm in cells}} \cdot 100 \right)^{\text{HDL}} - \left( \frac{\text{cpm in medium}}{\text{cpm in medium} + \text{cpm in cells}} \cdot 100 \right)^{\text{BSA}}$$

### **Lentiviral production and infection**

HA-tagged *RCAN1-1* and *RCAN1-4* cDNA were excised from pHA-CALP1L and pHA-CALP1S (a generous gift of Dr. S. de la Luna) and cloned into the lentiviral vector pHRSIN-IRES-GFP to generate pHRSIN-HA-RCAN1-1-IRES-GFP and pHRSIN-HA-RCAN1-4-IRES-GFP.

Lentiviruses expressing HA-RCAN1-1-IRES-GFP and HA-RCAN1-4-IRES-GFP were obtained by transient calcium phosphate transfection of HEK-293 cells, employing a three plasmid HIV-derived and VSV pseudotyped lentiviral system kindly provided by M. K. Collins (University College London, UK). The supernatant containing the lentiviral particles was collected 48 h after removal of the calcium phosphate precipitate, filtered through a 45  $\mu$ M PVDF membrane (Steriflip, Millipore) and ultracentrifuged for 2 h at 26,000 rpm, 4°C (Ultraclear Tubes, SW28 rotor and Optima L-100 XP Ultracentrifuge; Beckman). Viruses were resuspended in cold sterile DMEM and titrated in Jurkat cells by flow cytometry. Infection efficiency (GFP-expressing cells) and cell death (propidium iodide staining) were

monitored by flow cytometry. Similar infection efficiencies were obtained with the different constructs and across experiments.

Peritoneal macrophages ( $10^6$  cells) were plated, washed with PBS 24h later and infected with lentiviruses encoding IRES-GFP (Mock) or RCAN1-1-IRES-GFP plus RCAN1-4-IRES-GFP. After 24h, medium was replaced with AlphaMEM supplemented with 10% FBS. CD36 expression was assessed 48h later in GFP-f4/80 double-positive cells by flow cytometry. For foam-cell formation assays, culture medium was replaced after 24h of infection with AlphaMEM supplemented with 10% human lipoprotein-deficient serum. Cells were washed after 48h cells and then incubated with 50  $\mu$ g/ml oxLDL for 24h. oxLDL uptake was determined by Laurdan GP microscopy.

### **Antigen presentation**

Macrophages were cultured in 35-mm-diameter plates in the presence of 2 mg/ml OVA for 2 h. After washing several times with PBS, macrophages were cultured for 5 h in regular culture medium and  $\beta$ -galactosidase-expressing B3Z T cells ( $2 \times 10^6$ ) were added overnight. Antigen presentation was quantified by assessing the hydrolysis of chlorophenol red- $\beta$ -D-galactopyranoside (CPRG) (Calbiochem) with a spectrophotometer (O.D. 595-655)

### **Phagocytosis**

Macrophages ( $3 \times 10^5$ ) were cultured overnight on glass coverslips. Non-adherent cells were removed and macrophages were cultured without FBS for 2 h. Sheep red blood cells were opsonized with rabbit IgG or left untreated, and then added to the macrophage culture for 15 min. Cells were fixed, permeabilized and stained with phalloidin-TxRed (Invitrogen) and goat anti-rabbit 647 to detect phagocytosed particles. Internalized red blood cells were counted under a microscope.

### **Quantitative PCR analysis**

Total RNA was isolated with TRIZOL (Life Technologies), DNase-treated and reverse-transcribed at 37°C for 50 min in a 20 $\mu$ l reaction mix containing 200U Moloney murine leukemia virus (MMLV) reverse transcriptase (Life Technologies), 100ng random primers, and 40U RNase Inhibitor (Life Technologies). Reactions were terminated by heating at 95°C for 5 min. Real-time quantitative RT-PCR was performed using Prime Time qPCR assay (Integrated DNA Technologies) specific for human *GAPDH* (Hs.PT.39a.22214836), TaqMan

Gene Expression assays (Life Technologies) specific for human *RCAN1-1* (Hs01120956\_m1) and mouse *Rcan1* (Mm00627762\_m1) and *Hprt1* (Mm00446968\_m1) and a custom TaqMan Gene Expression assay specific for *RCAN1-4* (primers: GCAAACAGTGATATCTTCAGCGAAA, GTGATGTCCTTGTCATACGTCCTAA; probe: CAGGGCCAAATTT). SYBR Green was used for RT-PCR detection of *IL-10* (TGCTATGCTGCCTGCTCTTA, TCATTTCCGATAAAGGCTTGG), *Mrc1* (ATGCCAAGTGGGAAAATCTG, TGTAGCAGTGGCCTGCATAG), *Arg1* (CTCCAAGCCAAAGTCCTTAGAG, AGGAGCTGTCATTAGGGACATC), *Mcp-1* (ACACCCTACAAACCGGAACC, AGCCTTCCTGTCATAGTATTCCT), *Abca1* (AGTGATAATCAAAGTCAAAGGCACAC, AGCAACTTGGCACTAGTAACTCTG), *Abcg1* (TTCATCGTCCTGGGCATCTT, CGGATTTTGTATCTGAGGACGAA), *SR-A* (TGAACGAGAGGATGCTGACTG, GGAGGGGCCATTTTTAGTGC), *Mmp2* (GCACCACCGAGGACTATGAC, ACTTGTTGCCAGGAAAGTG), *Mmp9* (CAAATTCTTCTGGCGTGTGA, CGGTTGAAGCAAAGAAGGAG), *iNos* (CAGCTGGGCTGTACAAACCTT, CATTGGAAGTGAAGCGTTTCG) and m36B4 (GCGACCTGGAAGTCCAATA, ATCTGCTGCATCTGCTTGG). Calculations were made from measurements of 3 replicates of each sample. The amount of target mRNA in samples was estimated by the 2CT relative quantification method using *GAPDH*, *Hprt1* or m36B4 for normalization.

#### **CN phosphatase activity.**

CN enzyme activity in macrophage extracts was analyzed with the Biomol Green Calcineurin Assay kit (Enzo Life Sciences) according to the manufacturer's instructions.

#### **Statistical analysis.**

All values are expressed as means  $\pm$  SEM. Differences were evaluated using one-way or two-way analysis of variance (ANOVA) and Bonferroni's post-hoc test (experiments with  $\geq 3$  groups) or Student's t-test, as appropriate for the data. Statistical significance was assigned at  $p < 0.05$ .

## SUPPORTING INFORMATION REFERENCES

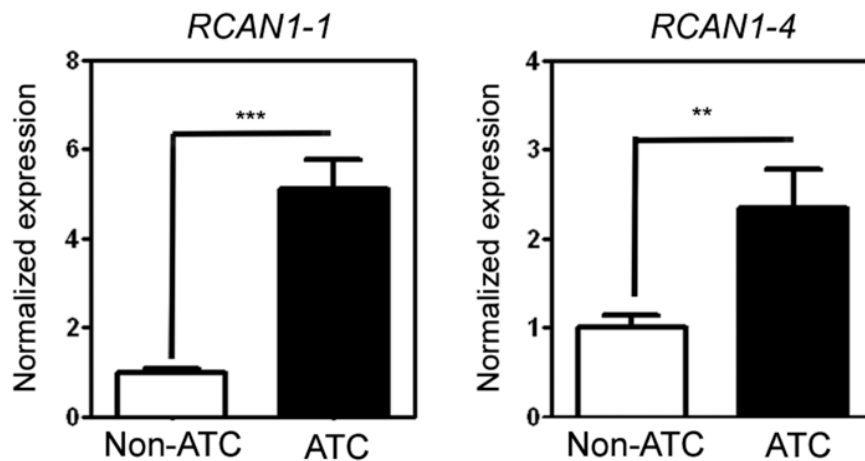
Bagatolli LA, Sanchez SA, Hazlett T, Gratton E (2003) Giant vesicles, Laurdan, and two-photon fluorescence microscopy: evidence of lipid lateral separation in bilayers. *Methods Enzymol* 360: 481-500

Esteban V, Mendez-Barbero N, Jimenez-Borreguero LJ, Roque M, Novensa L, Garcia-Redondo AB, Salaices M, Vila L, Arbones ML, Campanero MR et al (2011) Regulator of calcineurin 1 mediates pathological vascular wall remodeling. *J Exp Med* 208: 2125-2139

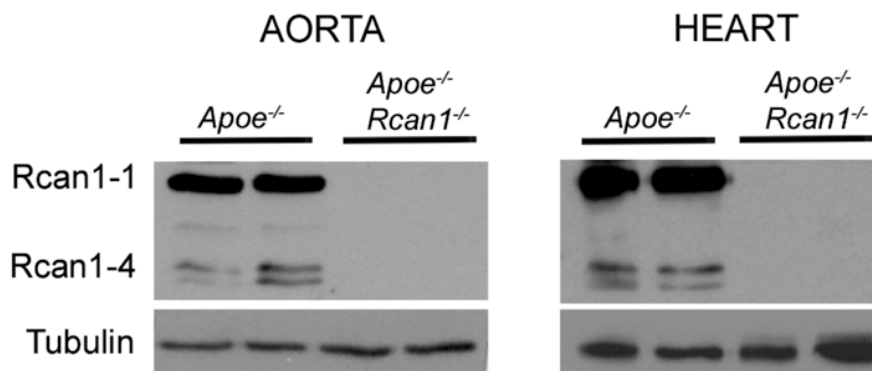
Fuster JJ, Gonzalez-Navarro H, Vinue A, Molina-Sanchez P, Andres-Manzano MJ, Nakayama KI, Nakayama K, Diez-Juan A, Bernad A, Rodriguez C et al (2011) Deficient p27 phosphorylation at serine 10 increases macrophage foam cell formation and aggravates atherosclerosis through a proliferation-independent mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31: 2455-2463

Porta S, Serra SA, Huch M, Valverde MA, Llorens F, Estivill X, Arbones ML, Marti E (2007) RCAN1 (DSCR1) increases neuronal susceptibility to oxidative stress: a potential pathogenic process in neurodegeneration. *Hum Mol Genet* 16: 1039-1050

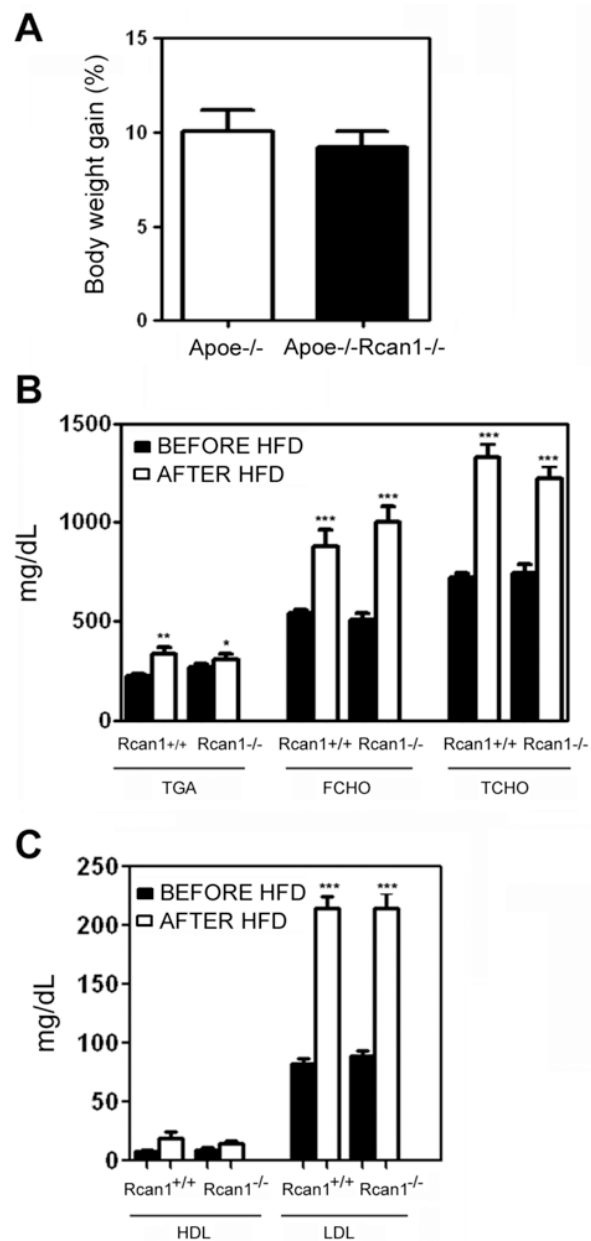
Sanchez SA, Tricerri MA, Gunther G, Gratton E (2007) Laurdan generalized polarization: from cuvette to microscope. In *Modern Research and Educational Topics in Microscopy: applications in physical/chemical sciences*, Mendez-Vilas A, Diaz J (eds) pp 1007-1014. Formatex



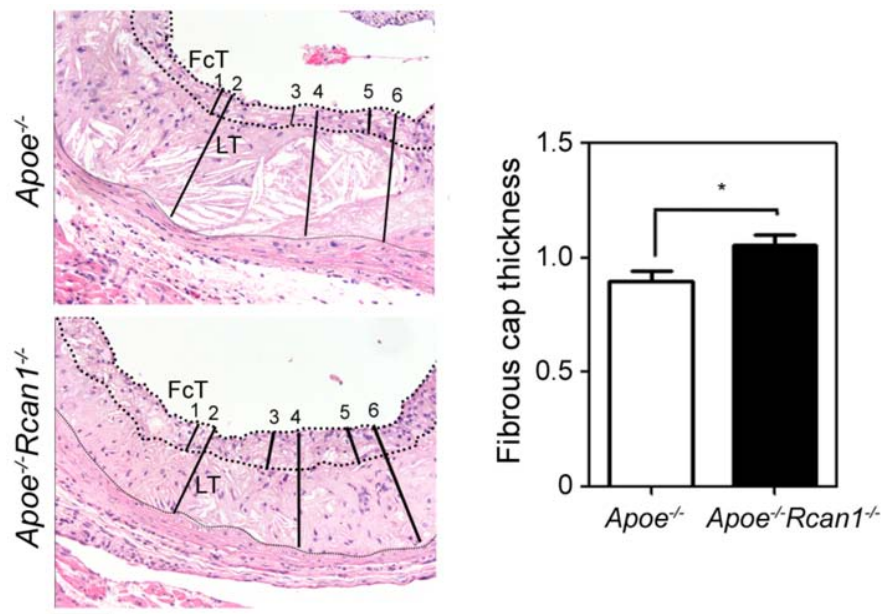
**Figure S1. *RCAN1* is induced in human atherosclerotic arteries.** Quantitative PCR analysis of *RCAN1-1* and *RCAN1-4* expression in atherosclerotic (ATC) and non-atherosclerotic (Non-ATC) human coronary arteries. mRNA amounts were normalized to *GAPDH* expression (means $\pm$ s.e.m). Student's t-test, \*\*p=0.008, \*\*\*p=0.0001.



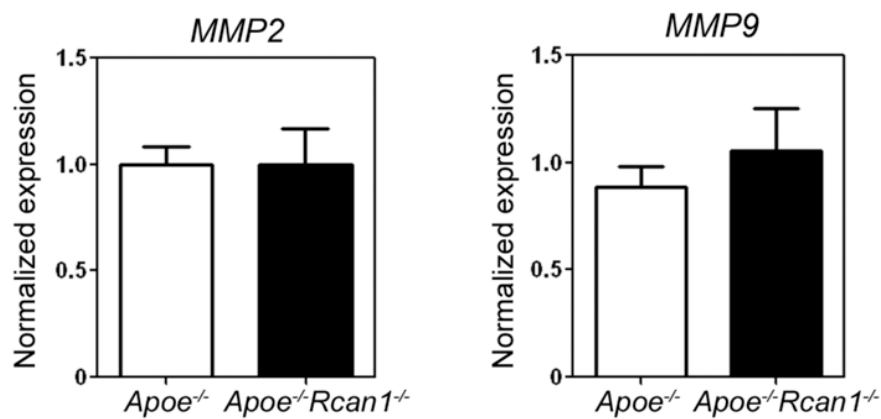
**Figure S2. *Rcan1* gene targeting ablates expression of Rcan1-1 and Rcan1-4.** Rcan1 immunoblot staining of aorta and heart tissue extracts from atherosclerotic *Apoe<sup>-/-</sup>* and *Apoe<sup>-/-</sup>Rcan1<sup>-/-</sup>* mice (one mouse per lane). Tubulin shows similar protein loading. Data are representative of 5 mice per group.



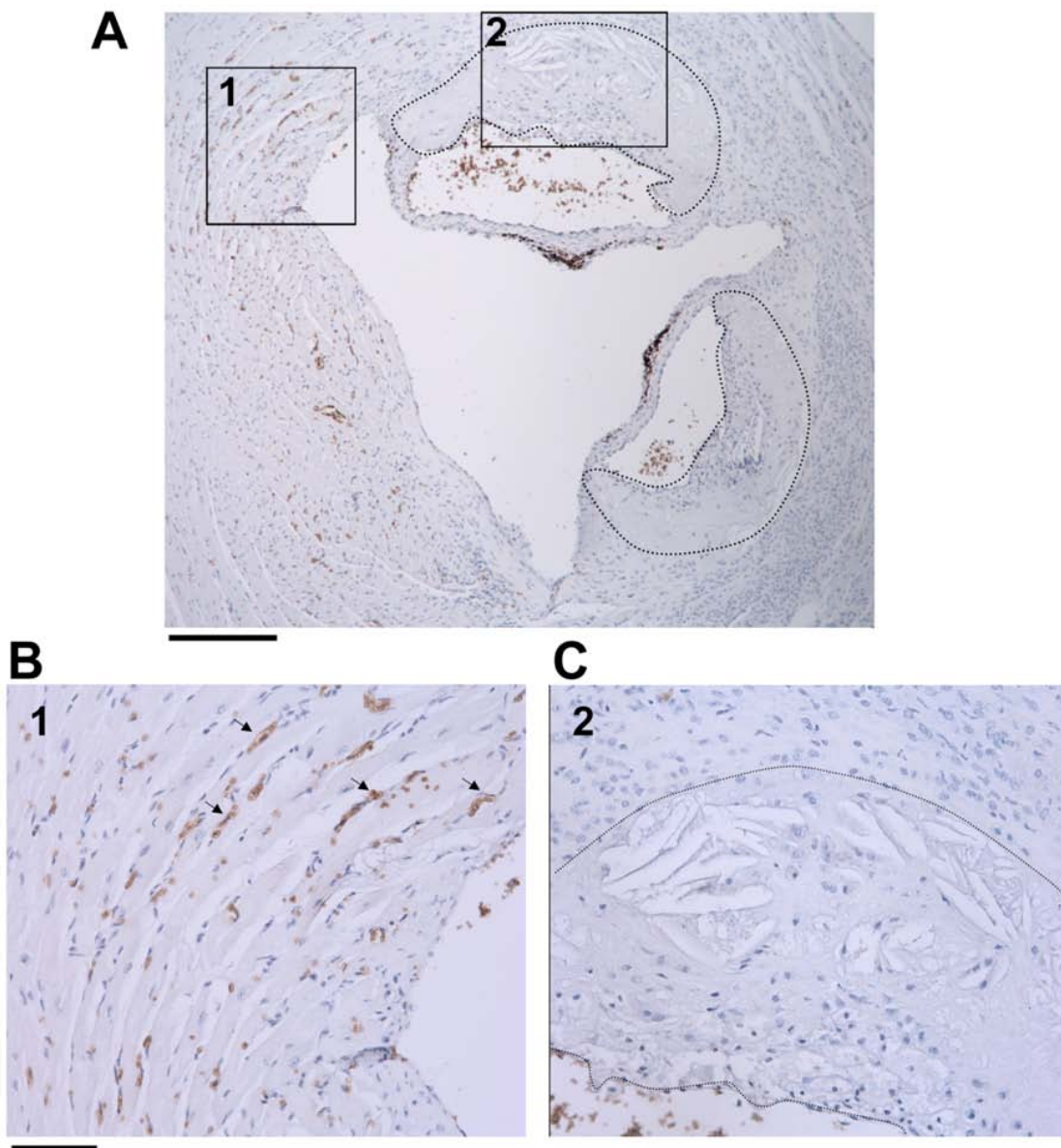
**Figure S3. HFD-induced body weight increase and lipid profile changes are not mediated by Rcan1.** (A) Body weight gain of *Apoe*<sup>-/-</sup> (*Rcan1*<sup>+/+</sup>; n=12) and *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> (*Rcan1*<sup>-/-</sup>; n=18) mice after 6 weeks on a HFD. (B) Serum concentration of triglyceride (TGA), free cholesterol (FCHO) and total cholesterol (TCHO) in these mice before and after diet (means±s.e.m). (C) Serum levels of high-density lipoproteins (HDL) and LDL in the same mice (means±s.e.m). One-way ANOVA, \*p=0.014, \*\*p=0.0036, \*\*\*p<0.00001.



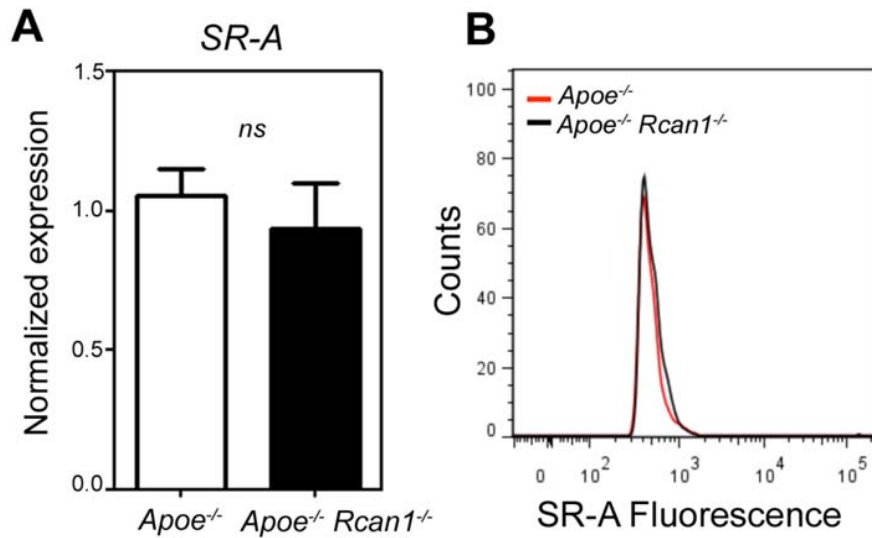
**Figure S4. *Rcan1* gene targeting increases fibrous cap thickness.** (A) Representative images of H&E staining of lesions in the aortic sinus of *Apoe*<sup>-/-</sup> (n=25 valves) and *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> mice (n=45 valves) fed a HFD for 6 wk. The average of three measurements of fibrous cap thickness (FcT) and lesion thickness (LT) taken in the center of each lesion was calculated. Odd and pair lines indicate the measurements of fibrous cap thickness and lesion thickness, respectively, taken in these particular lesions. Scale bar, 50  $\mu$ m. (B) Quantification of fibrous cap thickness relative to lesion thickness and normalized (means $\pm$ s.e.m; Student's t-test, \*p=0.016).



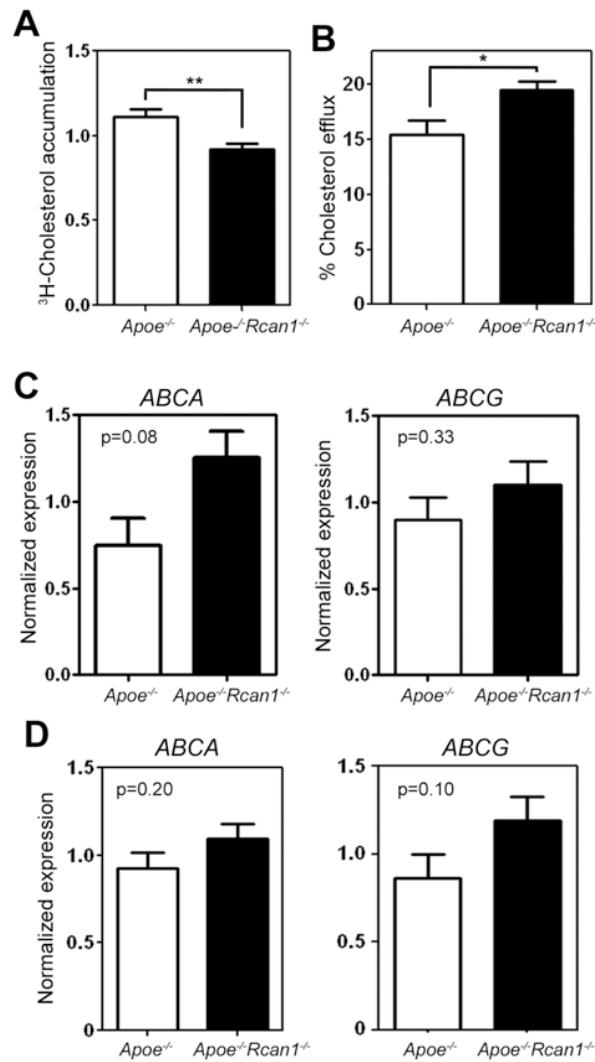
**Figure S5. *Rcan1* gene targeting does not increase *MMP2* or *MMP9* expression.** Quantitative PCR analysis of *MMP2* and *MMP9* expression in the aortic arch of atherosclerotic *Apoe*<sup>-/-</sup> (n=12) and *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> mice (n=14) pooled from three independent experiments. mRNA amounts were normalized to *m36B4* expression (means±s.e.m). Student's t-test, non-significant.



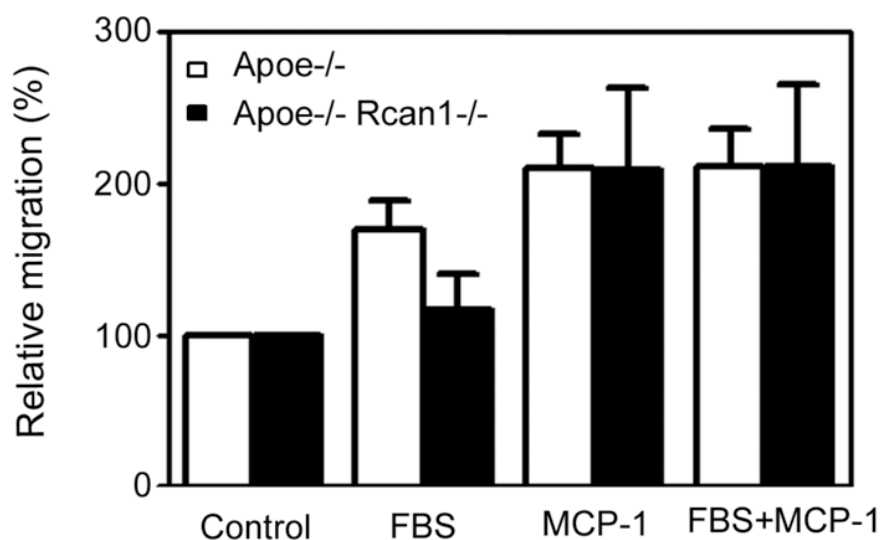
**Figure S6. *Rcan1* gene targeting does not induce intraplaque hemorrhage.** (A) Representative Ter-119 immunohistochemistry of the aortic sinus of an atherosclerotic *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> mouse. Scale bar, 200  $\mu$ m. (B-C) Enlargement of boxed regions 1 and 2. Erythrocytes (Ter-119<sup>+</sup> cells) are found only in the heart tissue (B) and the lumen (bottom left corner of C). Arrows point to Ter-119<sup>+</sup> cells. Scale bar, 50  $\mu$ m. Images are representative of 12 aortic valves from 4 *Apoe*<sup>-/-</sup> mice and of 12 lesions from 4 *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> mice.



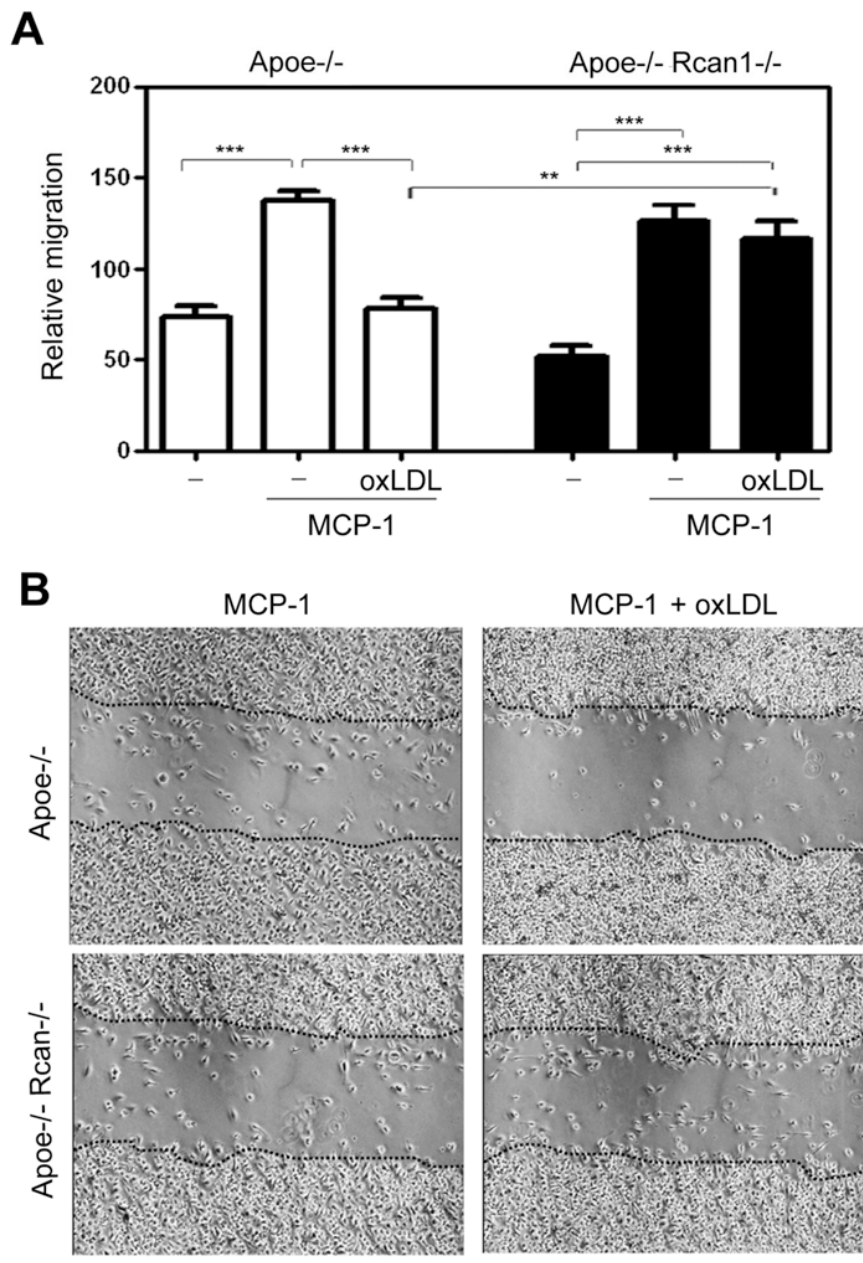
**Figure S7. SR-A expression is not affected by *Rcan1* gene targeting.** (A) Quantitative PCR analysis of *SR-A* expression in the aortic arch of atherosclerotic *Apoe*<sup>-/-</sup> (n=12) and *Apoe*<sup>-/-</sup> *Rcan1*<sup>-/-</sup> mice (n=13) pooled from three independent experiments. mRNA amounts were normalized to *m36B4* expression (means±s.e.m). Student's t-test, non-significant (*ns*). (B) Representative flow cytometry fluorescence histograms of SR-A-stained macrophages of the indicated genotypes.



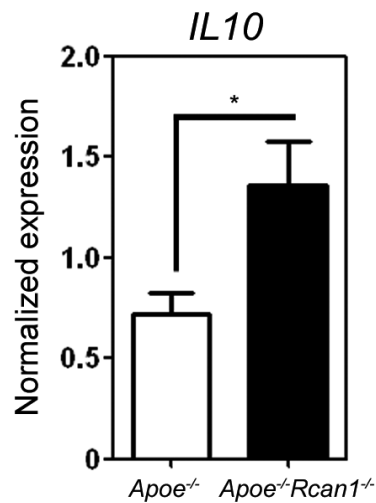
**Figure S8. Rcan1 is a modest regulator of cholesterol efflux in macrophages.** (A) <sup>3</sup>H-cholesterol accumulation in acLDL-loaded cultured peritoneal macrophages and (B) <sup>3</sup>H-cholesterol efflux in cultured peritoneal macrophages treated with 100  $\mu$ g/ml HDL for 24h. Data are means $\pm$ s.e.m (n=4). Student's t-test, \*p=0.04, \*\*p=0.005. Quantitative PCR analysis of *ABCA* and *ABCG* expression in (C) cultured peritoneal macrophages (n=4) and (D) the aortic arch of atherosclerotic *Apoe*<sup>-/-</sup> (n=12) and *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> mice (n=13) pooled from three independent experiments. mRNA amounts were normalized to *m36B4* expression (means $\pm$ s.e.m). Student's t-test, as indicated.



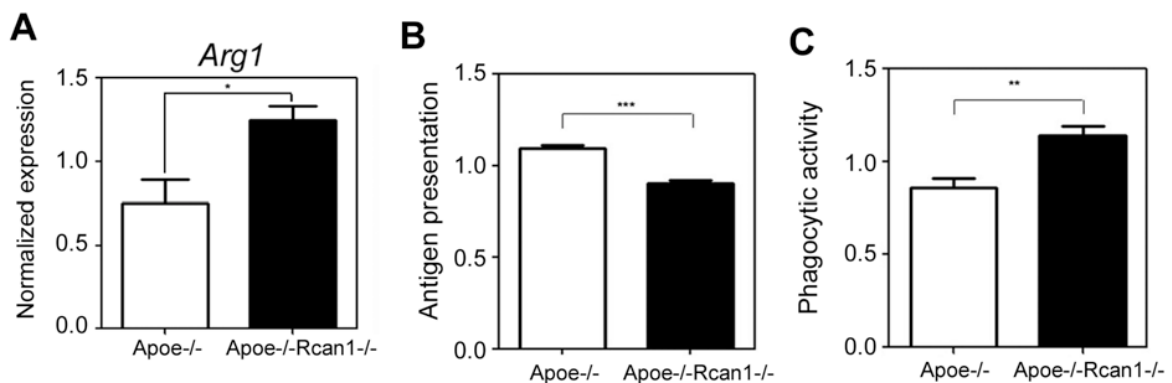
**Figure S9. *Rcan1* does not mediate macrophage chemotaxis.** *Apoe*<sup>-/-</sup> and *Apoe*<sup>-/-</sup> *Rcan1*<sup>-/-</sup> macrophages were seeded on the upper surface of chemotaxis chambers containing medium alone (Control) or medium supplemented with FBS, MCP-1 or FBS plus MCP-1. After 18 h, non-migrating cells were removed from the upper filter surfaces and the filter was stained with Hoechst. Quantification of migrated macrophages in ten fields per condition. Data are shown relative to non-treated cells (mean ± s.e.m, n=4).



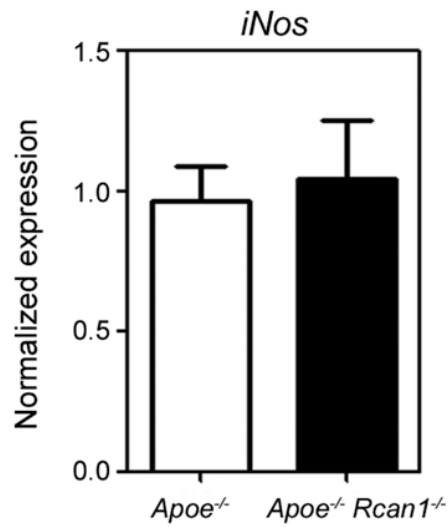
**Figure S10. Macrophage motility is inhibited by oxLDL in an *Rcan1*-dependent manner.** A single scrape wound was made on confluent plated *Apoe*<sup>-/-</sup> and *Apoe*<sup>-/-</sup> *Rcan1*<sup>-/-</sup> macrophages, and cells were then incubated in medium alone or medium supplemented with 100 ng/ml MCP-1 or 100 ng/ml MCP-1 plus 50  $\mu$ g/ml oxLDL. Migration into the denuded area was monitored by photomicroscopy. (A) Quantification of migrated macrophages in ten fields per condition. Data show number of cells relative to the surface area of the scrape (mean  $\pm$  s.e.m n=3; one-way ANOVA, \*\*p=0.0037, \*\*\*p<0.0001). (B) Representative images of macrophages in scraped regions. Bar, 100  $\mu$ m.



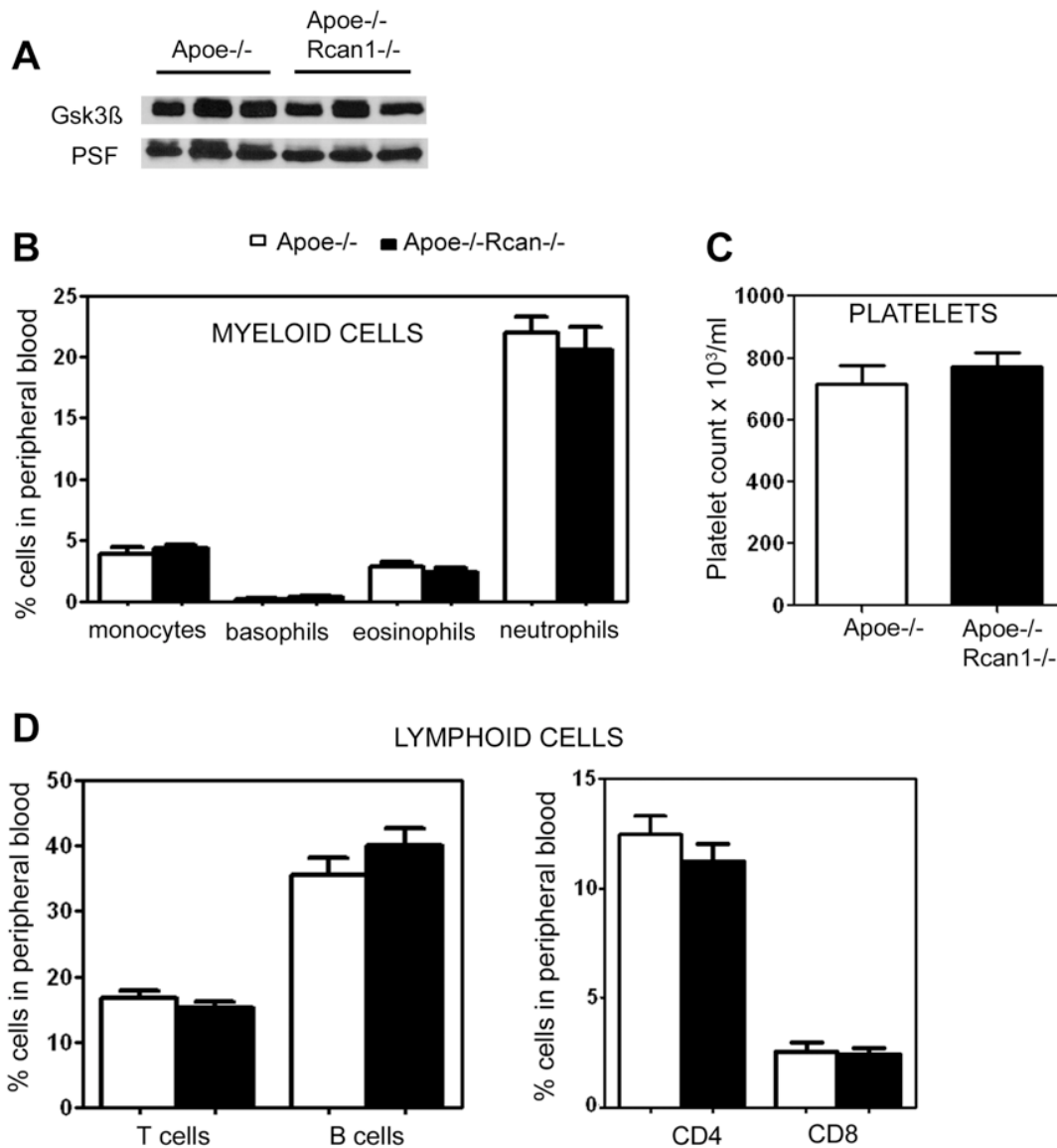
**Figure S11. *Rcan1* gene targeting increases IL10 gene expression in the aortic arch of atherosclerotic mice.** Quantitative PCR analysis of *IL10* expression in the aortic arch of atherosclerotic *Apoe*<sup>-/-</sup> (n=12) and *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> mice (n=13) pooled from three independent experiments. mRNA amounts were normalized to *m36B4* expression (means±s.e.m). Student's t-test, \*p=0.0108.



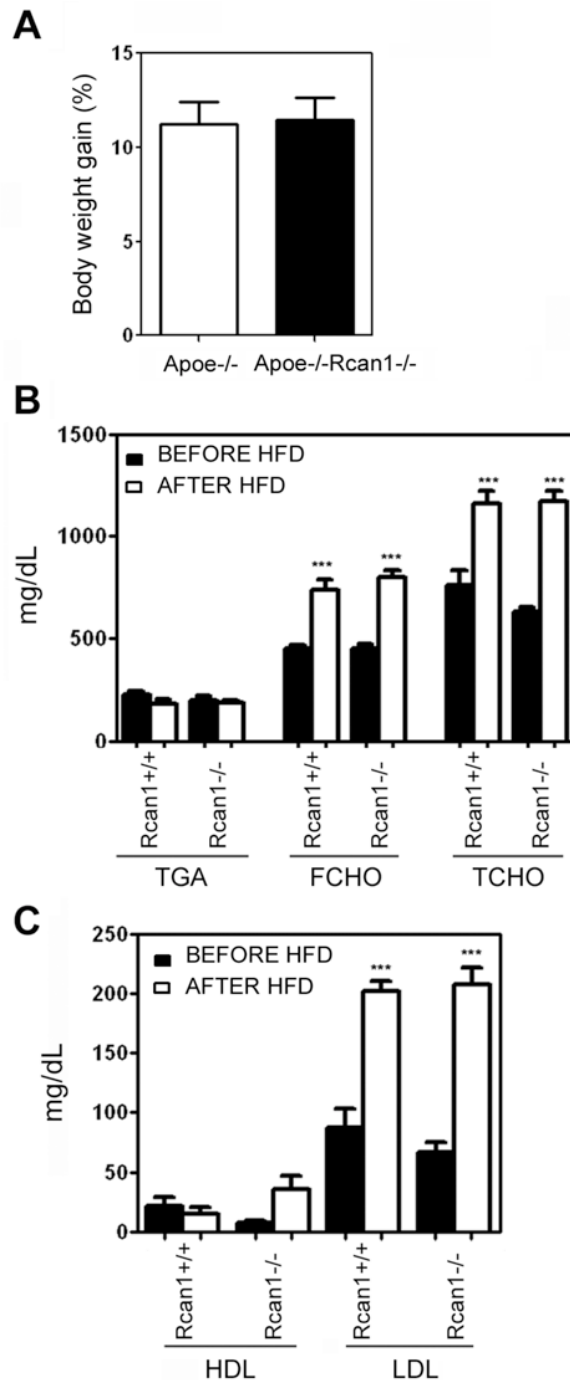
**Figure S12. *Rcan1* regulates *Arg1* expression, antigen presentation and phagocytic activity in macrophages.** (A) Quantitative PCR analysis of *Arg-1* mRNA expression in *Apoe*<sup>-/-</sup> and *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> peritoneal macrophages. mRNA amounts were normalized to *m36B4* expression (mean±s.e.m; n=7). (B) Antigen (ovalbumin) presentation by *Apoe*<sup>-/-</sup> and *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> macrophages to B3Z T-cell hybridoma cells. Data are means±s.e.m (n=4). (C) The number of phagocytized red blood cells is shown relative to that of by *Apoe*<sup>-/-</sup> or *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> macrophages (means±s.e.m; n=4). Student's t-test \*p=0.011, \*\*p<0.0077, \*\*\*p<0.0001.



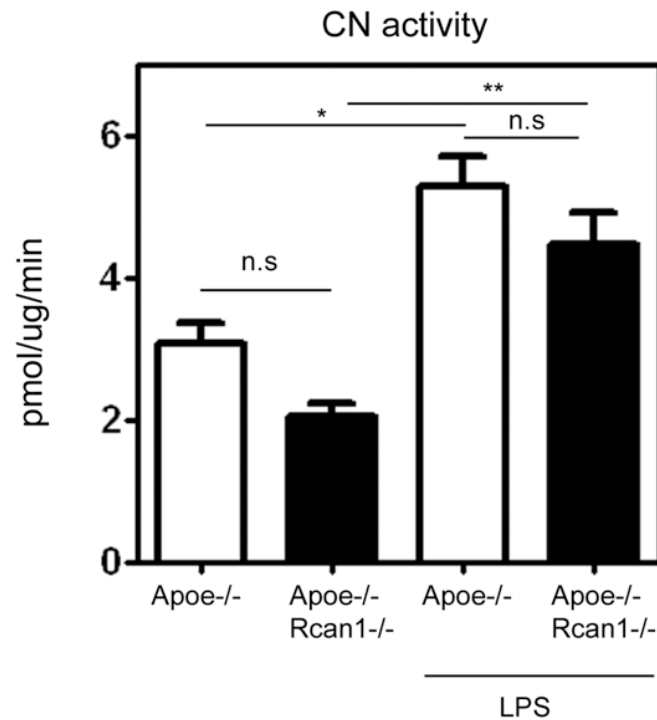
**Figure S13. Rcan1 does not regulate *iNos* expression in atherosclerotic lesions.** Quantitative PCR analysis of *iNos* mRNA expression in the aortic arch of atherosclerotic Apoe<sup>-/-</sup> (n=12) and Apoe<sup>-/-</sup>Rcan1<sup>-/-</sup> mice (n=13) pooled from three independent experiments. mRNA amounts were normalized to *m36B4* expression (means±s.e.m).



**Figure S14. Rcan1 does not alter the nature of BM reconstitution.** (A) Immunoblot analysis of Gsk3β and PSF expression in BM cells of *Apoe*<sup>-/-</sup> mice transplanted with BM from *Apoe*<sup>-/-</sup> or *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> mice. (B - D) Analysis of leukocyte populations 4 weeks after instilling *Apoe*<sup>-/-</sup> mice with BM from *Apoe*<sup>-/-</sup> (n=8) or *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> mice (n=8). Data were pooled from two independent experiments and show (B) percentage of myeloid cell populations, (C) number of platelets and (D) percentage of lymphoid cell populations (means±s.em) and were pooled from two independent experiments.



**Figure S15. Metabolic parameters in transplanted mice.** (A) Body weight gain of *Apoe*<sup>-/-</sup> mice transplanted with BM from *Apoe*<sup>-/-</sup> (*Rcan1*<sup>+/+</sup>; n=16) or *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> mice (*Rcan1*<sup>-/-</sup>; n=15) after 6 weeks on a HFD. (B) Serum concentrations of triglyceride, total cholesterol (TCHO) and free cholesterol (FCHO) in these mice before and after the HFD (means±s.e.m). (C) Serum concentrations of HDL and LDL in the same mice (means±s.e.m). Data were pooled from three independent experiments. One-way ANOVA, \*\*\*p<0.0001.



**Figure S16. *Rcan1* gene targeting does not alter CN activity in macrophages.** CN enzymatic activity against phosphopeptide RII measured in *Apoe*<sup>-/-</sup> or *Apoe*<sup>-/-</sup>*Rcan1*<sup>-/-</sup> peritoneal macrophages that were unstimulated or treated with 1 $\mu$ M lipopolysaccharide (LPS) for 20 minutes. Values are the means  $\pm$  SEM of duplicate determinations for each condition from four independent experiments. One-way ANOVA, \* $p=0.017$ , \*\* $p=0.004$ , n.s., non-significant.

Anexo II





## ARTICLES

nature  
medicineNitric oxide mediates aortic disease in mice deficient in the metalloprotease *Adamts1* and in a mouse model of Marfan syndrome

Jorge Oller<sup>1,10</sup>, Nerea Méndez-Barbero<sup>1,10</sup>, E Josue Ruiz<sup>1</sup>, Silvia Villahoz<sup>1</sup>, Marjolijn Renard<sup>2</sup>, Lizet I Canelas<sup>1</sup>, Ana M Briones<sup>3</sup>, Rut Alberca<sup>1</sup>, Noelia Lozano-Vidal<sup>1</sup>, María A Hurlé<sup>4</sup>, Dianna Milewicz<sup>5</sup>, Arturo Evangelista<sup>6</sup>, Mercedes Salas<sup>3</sup>, J Francisco Nistal<sup>4</sup>, Luis Jesús Jiménez-Borreguero<sup>7</sup>, Julie De Backer<sup>3</sup>, Miguel R Campanero<sup>8,11</sup> & Juan Miguel Redondo<sup>1,9,11</sup>

**Heritable thoracic aortic aneurysms and dissections (TAAD), including Marfan syndrome (MFS), currently lack a cure, and causative mutations have been identified for only a fraction of affected families. Here we identify the metalloproteinase ADAMTS1 and inducible nitric oxide synthase (NOS2) as therapeutic targets in individuals with TAAD. We show that *Adamts1* is a major mediator of vascular homeostasis, given that genetic haploinsufficiency of *Adamts1* in mice causes TAAD similar to MFS. Aortic nitric oxide and *Nos2* levels were higher in *Adamts1*-deficient mice and in a mouse model of MFS (hereafter referred to as MFS mice), and *Nos2* inactivation protected both types of mice from aortic pathology. Pharmacological inhibition of *Nos2* rapidly reversed aortic dilation and medial degeneration in young *Adamts1*-deficient mice and in young or old MFS mice. Patients with MFS showed elevated *NOS2* and decreased ADAMTS1 protein levels in the aorta. These findings uncover a possible causative role for the ADAMTS1–NOS2 axis in human TAAD and warrant evaluation of NOS2 inhibitors for therapy.**

Aortic aneurysm (AA) and dissections account for 1–2% of all deaths in industrialized countries. Thoracic AA (TAA) is strongly associated with familial genetic predisposition and involves gene variants that show high penetrance. TAA and dissections (TAAD) can appear in isolation (familial TAAD) or together with features of a systemic connective tissue disorder (syndromic TAAD), such as that in MFS.

Syndromic and nonsyndromic TAAD are associated with increased transforming growth factor (TGF)- $\beta$  signaling<sup>1–3</sup>. TGF- $\beta$  activation has been proposed to cause aortic medial degeneration, a typical histopathological feature of TAAD, which is characterized by an enlarged and weakened medial layer, fibrosis, proteoglycan accumulation, and elastic fiber disorganization and fragmentation<sup>4</sup>. However, it is unclear whether TGF- $\beta$  activation is a cause or a consequence of TAAD. Consistent with a pathogenic role of TGF- $\beta$  in TAAD, neutralizing antibodies to TGF- $\beta$  prevent aortic dilation and inhibit fragmentation of elastic lamellae in a mouse model of mild MFS<sup>5</sup>. In the same model, these processes are also inhibited by losartan, an angiotensin-II (Ang-II) type I receptor (AT1R) antagonist that inhibits TGF- $\beta$  signaling<sup>5,6</sup>. However, in clinical trial, losartan was not more effective at reducing the rate of aortic root enlargement

than the beta blocker atenolol, and dual therapy with both losartan and atenolol produced no additional benefit<sup>7–9</sup>.

Little is known about the mechanisms by which Ang-II promotes aneurysms. We recently showed that Ang-II and other stimuli associated with vascular remodeling induce aortic expression of a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 1 (ADAMTS1)<sup>10</sup>, raising the possibility that ADAMTS1 might mediate Ang-II-induced aneurysms. ADAMTS1, a member of the proteoglycan-degrading ADAMTS metalloproteinase family, is expressed in aortic endothelial cells and in vascular smooth muscle cells (VSMCs)<sup>11,12</sup>. It is also expressed in tissue from TAA lesions and is active in normal aortic tissue, where it cleaves versican and aggrecan<sup>13,14</sup>. However, the role of *Adamts1* in aneurysm development is unknown.

**RESULTS****A syndromic form of TAA is triggered by a constitutive *Adamts1* deficiency**

To investigate the contribution of *Adamts1* to Ang-II-elicited aortic dilation and aneurysm, we used *Adamts1*-deficient mice from the European Mouse Mutant Archive (EM:02291). Previously described

<sup>1</sup>Gene regulation in cardiovascular remodeling and inflammation group, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC), Madrid, Spain. <sup>2</sup>Center for Medical Genetics Ghent, Ghent University Hospital, Ghent, Belgium. <sup>3</sup>Department of Pharmacology, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain. <sup>4</sup>Cardiovascular Surgery and Department of Physiology and Pharmacology, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, IDIVAL, Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria, Santander, Spain. <sup>5</sup>Division of Medical Genetics, University of Texas, Houston, USA. <sup>6</sup>Servei de Cardiologia, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain. <sup>7</sup>Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares and Hospital de la Princesa, Madrid, Spain. <sup>8</sup>Department of Cancer Biology, Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, Consejo Superior de Investigaciones Científicas–Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain. <sup>9</sup>Centro de Investigaciones Biomédicas en RED en Enfermedades Cardiovasculares (CIBERCV), Spain. <sup>10</sup>These authors contributed equally to this work. <sup>11</sup>These authors jointly directed this work. Correspondence should be addressed to M.R.C. (mcampanero@iib.uam.es) or J.M.R. (jredondo@cnic.es).

Received 24 June 2016; accepted 13 December 2016; published online 9 January 2017; doi:10.1038/nm.4266

*Adamts1*<sup>-/-</sup> mice have congenital kidney malformations and high perinatal mortality<sup>15</sup>, but no vascular phenotype has been reported. Our *Adamts1*<sup>+/-</sup> mice expressed lower levels of *Adamts1* in the aorta than wild-type (WT) littermates (Fig. 1a and Supplementary Fig. 1a). We did not study *Adamts1*<sup>-/-</sup> mice because these mice had very low survival at the time of weaning (Supplementary Fig. 1b). By contrast, the survival of *Adamts1*<sup>+/-</sup> mice was similar to that of their WT littermates, and *Adamts1*<sup>+/-</sup> mice seemed to be healthy at this stage. Treatment of 8-week-old WT mice with Ang-II for 28 d promoted generalized aortic dilation, which was confirmed by ultrasonography of the aortic ring (AR), the ascending aorta (AsAo) and the abdominal aorta (AbAo) (Fig. 1b,c). In contrast to WT mice, untreated *Adamts1*<sup>+/-</sup> mice showed aortic dilation, which was exacerbated by Ang-II treatment (Fig. 1b,c). In addition, whereas Ang-II treatment induced AA or lethal aortic dissections in only 1 of 12 WT mice, this treatment rapidly triggered AA or lethal aortic dissections in 7 of 15 *Adamts1*<sup>+/-</sup> mice; this occurred in the AsAo in three mice and in the AbAo in four mice (Fig. 1d,e). No aneurysms or lethal dissections were detected in untreated *Adamts1*<sup>+/-</sup> mice at this age. Because Ang-II induces hypertension, we investigated whether *Adamts1* inactivation would also have a pro-hypertensive effect. However, unlike Ang-II treatment, *Adamts1* gene dose reduction led to a reduction in both systolic and diastolic blood pressure (BP) (Fig. 1f).

In line with previous observations of developmental kidney abnormalities in other *Adamts1*-targeted mice<sup>15</sup>, we found that the kidneys of our *Adamts1*<sup>+/-</sup> mice had an enlarged caliceal space, indicative of hydronephrosis (Supplementary Fig. 1c). However, levels of urea and creatinine in the plasma were similar in WT and *Adamts1*<sup>+/-</sup> mice (Supplementary Fig. 1d,e), suggesting that renal function was not compromised.

The presence of renal abnormalities raised the possibility that the aortic pathology induced by *Adamts1* deficiency might be syndromic. Syndromic aortic conditions in humans and mice, including MFS, involve alterations to the lungs and skeleton<sup>16-19</sup>. Examination of 3-month-old *Adamts1*<sup>+/-</sup> mice revealed a marked increase in distal airspace caliber, which is characteristic of emphysema (Fig. 1g). Moreover, kyphosis was detected in 44.4% of 3- to 4-month-old *Adamts1*<sup>+/-</sup> mice (Fig. 1h), which was associated with increased anteroposterior and transverse diameters of the chest due to overgrowth of the ribs (Fig. 1i). Other long bones (humerus, tibia and femur) were also longer in sex-matched *Adamts1*<sup>+/-</sup> mice than in WT mice, whereas there were no differences in cranial size and morphology between the *Adamts1*<sup>+/-</sup> and WT mice (Fig. 1j,k).

### TAA is promoted by knockdown of *Adamts1* expression in the aorta

To investigate the direct effects of *Adamts1* deficiency on aortic dilation, we knocked down its expression in the aorta of adult mice by using lentivirus encoding an *Adamts1*-specific siRNA. By screening candidate small interfering RNAs (siRNAs) specific for *Adamts1* in cultured VSMCs, we identified siRNA-27 as having high silencing capacity (Supplementary Fig. 1f,g). The siRNA-encoding lentivirus also encoded green fluorescent protein (GFP) to facilitate assessment of transduction efficiency. Intrajugular delivery of lentivirus encoding siRNA-27 (hereafter referred to as si*Adamts1*) into C57BL/6 mice<sup>20</sup> yielded efficient and long-term transduction of all aortic wall layers, as determined by GFP immunostaining of the AsAo, thoracic descending aorta and AbAo 7 weeks after lentiviral delivery (Fig. 2a,b and Supplementary Fig. 1h). *Adamts1* mRNA and *Adamts1* protein expression was almost undetectable in aortic samples from mice that were inoculated with si*Adamts1*-expressing lentivirus (Fig. 2b,c and Supplementary Fig. 1h,i), even when the mice were treated with Ang-II for the last 4 weeks prior to the evaluation of *Adamts1* expression (Fig. 2c and Supplementary Fig. 1i). Indeed, aortic *Adamts1* mRNA levels were lower in si*Adamts1*-transduced mice than in *Adamts1*<sup>+/-</sup> mice (Supplementary Fig. 1i). Silencing of *Adamts1* expression was confirmed in all layers of the AsAo, thoracic descending aorta and AbAo (Fig. 2b and Supplementary Fig. 1h). Consistent with the results obtained for *Adamts1*<sup>+/-</sup> mice, *Adamts1* silencing in the adult aorta led to decreased systolic and diastolic BP (Fig. 2d), as well as strong dilation of the AR, AsAo and AbAo; this dilation was further increased by treatment with Ang-II (Fig. 2e and Supplementary Fig. 1j). In addition, Ang-II treatment of si*Adamts1*-transduced mice caused aneurysms in 13 of 16 mice and lethal dissections in 4 of 16 mice, whereas Ang-II treatment of mice that were transduced with a control siRNA (siCtrl) caused aneurysm in only 1 of 13 mice, and none developed lethal dissections. No aneurysms or lethal dissections were detected in si*Adamts1*-expressing mice at this age in the absence of Ang-II treatment.

### Medial degeneration and activation of the TGF- $\beta$ pathway in the aortic wall of *Adamts1* deficient mice

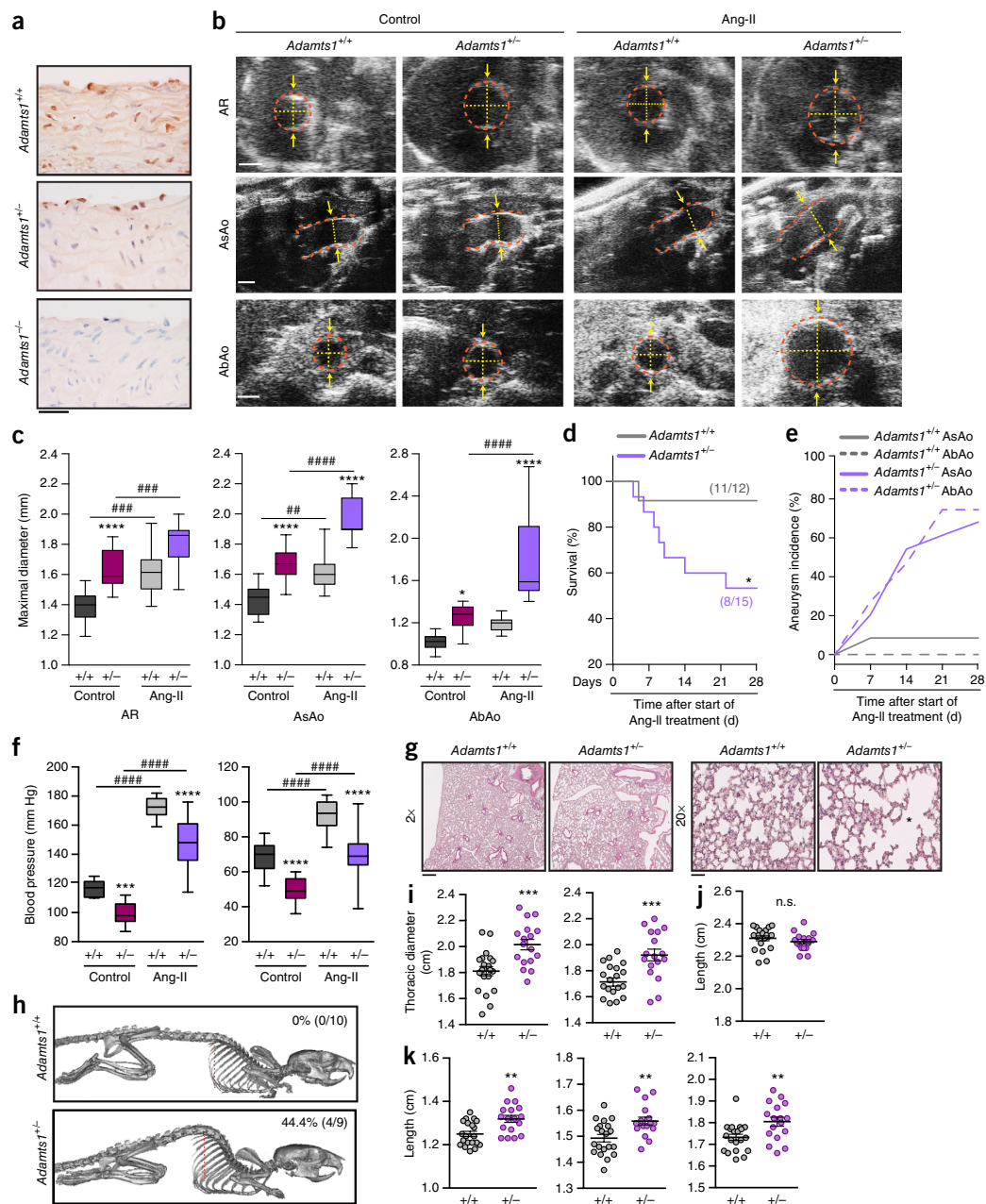
Reduction of *Adamts1* levels in mice by either genetic inactivation or transduction of a lentivirus expressing si*Adamts1* caused the characteristic features of medial degeneration: elastic fiber fragmentation and disarray, excessive collagen deposition and proteoglycan accumulation, as assessed by histologic analysis of the AsAo and the AbAo (Fig. 2f-h and Supplementary Fig. 2a-e). These features were exacerbated by Ang-II treatment of the mice (Fig. 2f-h and Supplementary Fig. 2a-e).

**Figure 1** Induction of syndromic TAA by *Adamts1* deficiency. (a) Representative images of *Adamts1* immunostaining in aortic sections from the indicated strains of mice ( $n = 3$  per group). Scale bar, 20  $\mu\text{m}$ . (b,c) Representative ultrasound images (b) and maximal diameters (c) of AR, AsAo and AbAo from vehicle-treated (control) (*Adamts1*<sup>+/+</sup> (+/+),  $n = 13$ ; *Adamts1*<sup>+/-</sup> (+/-),  $n = 15$ ) and Ang-II-treated (*Adamts1*<sup>+/+</sup>,  $n = 11$ ; *Adamts1*<sup>+/-</sup>,  $n = 14$ ) mice for 28 d. In b, red dashed lines mark the lumen boundary, and the yellow dashed lines mark the lumen diameter. Data are presented as box-and-whisker plots, with 75th and 25th percentiles; bars represent maximal and minimal values. \* $P < 0.05$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$  (*Adamts1*<sup>+/+</sup> versus *Adamts1*<sup>+/-</sup> mice); ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$ , #### $P > 0.0001$  (vehicle- versus Ang-II-treated mice); by two-way analysis of variance (ANOVA). Scale bars, 1 mm. (d) Survival curve of Ang-II-treated (*Adamts1*<sup>+/+</sup>,  $n = 12$ ; *Adamts1*<sup>+/-</sup>,  $n = 15$ ) mice for 28 d. \* $P < 0.05$  by log-rank (Mantel-Cox) test. The numbers shown indicate the number of live mice versus the total number of mice at 28 d after the start of Ang-II treatment. (e) Aneurysm incidence in AsAo and AbAo in the Ang-II-treated cohorts of mice shown in d. (f) End-of-treatment systolic (left) and diastolic (right) BP in the cohorts of mice shown in c. Data are presented as box-and-whisker plots, with 75th and 25th percentiles; bars represent maximal and minimal values. \*\*\* $P < 0.01$  and \*\*\*\* $P < 0.001$  (*Adamts1*<sup>+/+</sup> versus *Adamts1*<sup>+/-</sup> mice); #### $P < 0.0001$  (control- versus Ang-II-treated mice); by two-way ANOVA. (g) Representative H&E-stained sections from formalin-fixed lungs of *Adamts1*<sup>+/+</sup> ( $n = 10$ ) and *Adamts1*<sup>+/-</sup> ( $n = 7$ ) mice. The asterisk marks the distal airspace, which is enlarged in lungs of *Adamts1*<sup>+/-</sup> mice. Scale bars, 500  $\mu\text{m}$  (2 $\times$ ), 50  $\mu\text{m}$  (20 $\times$ ). (h) Representative skeletal positron emission tomography-computed tomography (PET-CT) images of 16- to 20-week-old *Adamts1*<sup>+/+</sup> ( $n = 10$ ) (top) and *Adamts1*<sup>+/-</sup> ( $n = 9$ ) (bottom) mice. Red dashed lines, 1.67 cm; scale bar, 1 cm. Kyphosis incidence is indicated. (i-k) Quantification of the diameter of the anteroposterior (left) and transverse (right) thorax (i), and length of the cranium (j), humerus (left), femur (middle) and tibia (right) (k) from *Adamts1*<sup>+/+</sup> ( $n = 20$ ) and *Adamts1*<sup>+/-</sup> ( $n = 17$ ) mice. Data are mean  $\pm$  s.e.m. \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ; n.s., not significant; by Student's *t*-test.

ARTICLES

Aortic medial degeneration in Marfan and Loeys–Dietz syndromes is linked to activation of the TGF- $\beta$  pathway<sup>17,21</sup>. Activation of this pathway leads to phosphorylation of the transcription factors Smad2 and Smad3, their subsequent translocation to the nucleus and transcriptional induction of their target genes, including connective tissue growth factor (*Ctgf*), collagen, type I, alpha 1 (*Col1a1*) and serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade E, member 1 (*Serpine1*; also called *Pai1*). Immunohistochemistry of aortic sections from *Adamts1*<sup>+/-</sup> mice

revealed increased TGF- $\beta$ 1 and Smad2–Smad3 expression (Fig. 2i) and increased Smad2 activation, as seen by increased levels of phosphorylation and nuclear localization of Smad2, than in WT mice (Fig. 2i). Similarly, *Adamts1* knockdown in mice showed increased Smad2–Smad3 expression and Smad2 activation in the aorta (Supplementary Fig. 3a). Increased Smad2–Smad3 expression and Smad2 activation were also evident in sections from the AsAo of *Adamts1*<sup>+/-</sup> mice, as assessed by immunofluorescence



(Supplementary Fig. 3b). Moreover, we observed similar results in aortic sections from MFS mice (Supplementary Fig. 3b); this mouse strain is heterozygous for an allele of fibrillin 1 (*Fbn1*) containing a mutation (C1039G)<sup>18</sup> that is equivalent to a mutation frequently found in patients with MFS. Consistent with activation of TGF- $\beta$  signaling, aortas from *Adamts1*<sup>+/-</sup> and siAdamts1-expressing mice had higher mRNA levels of the TGF- $\beta$  transcriptional targets *Ctgf*, *Coll1a1* and *Pail1* than aortas from WT and siCtl-expressing mice, respectively (Supplementary Fig. 3c,d).

#### Aortic dilation induced by *Adamts1* deficiency is rapid and independent of TGF- $\beta$

To assess the pathogenesis of aortopathy caused by an *Adamts1* deficiency, we monitored AsAo and AbAo diameters and BP after intrajugular inoculation of the siCtl- or siAdamts1-expressing lentivirus (Fig. 3a). Levels of *Adamts1* mRNA and *Adamts1* protein were decreased as early as 1–2 d after inoculation of mice with siAdamts1-expressing lentivirus than in mice inoculated with siCtl-expressing lentivirus (Fig. 3b and Supplementary Fig. 4a), which was followed immediately by a drop in BP and the induction of elastolysis (Fig. 3c,d and Supplementary Fig. 4b,c). There was no significant increase in aortic diameter until 3 d after inoculation (Fig. 3e), whereas collagen deposition in the aortic wall (Fig. 3f) and transcriptional activation of the TGF- $\beta$  pathway (Supplementary Fig. 4d) did not occur until 1–2 weeks after inoculation. The early induction of elastolysis prompted us to assess the activities of matrix metalloproteinase 2 (Mmp2) and Mmp9, key elastolytic proteins in the aortic wall. Mmp9 activity but not Mmp2 activity was rapidly and markedly induced after *Adamts1* silencing (Fig. 3g), and increased levels of Mmp9 in smooth muscle actin (SMA)-positive cells of the tunica media were detected in AsAo sections by immunofluorescence (Fig. 3h). Notably, macrophages, a known source of Mmp9 in inflammatory diseases<sup>22</sup>, were almost absent from these aortic sections (Fig. 3h) but were readily detected in atheroma plaques in mice deficient in apolipoprotein E (*ApoE*<sup>-/-</sup> mice)<sup>23</sup>, which were used as a control for macrophage staining (Fig. 3h). These results therefore support the idea that VSMCs are the major source of Mmp9 in the diseased aorta of *Adamts1*-expressing mice.

Canonical and noncanonical pathways of TGF- $\beta$  activation have critical roles in a mouse model of MFS, and treatment of such mice with a TGF- $\beta$ -neutralizing antibody or the AT1R antagonist losartan can prevent aneurysm formation<sup>5</sup>. Although the timing of TGF- $\beta$  activation after *Adamts1* silencing suggested a secondary role in aortopathy onset, we tested the contribution of the TGF- $\beta$  pathway by treating siAdamts1-inoculated mice with losartan or a TGF- $\beta$ -neutralizing

antibody (Fig. 3i). Notably, neither treatment reduced siAdamts1-induced aortic dilation (Fig. 3j and Supplementary Fig. 4e), hypotension (Supplementary Fig. 4f), or elastic fiber fragmentation or fibrosis (Fig. 3k,l). As a confirmation that the neutralizing antibody was correctly administered and had neutralizing activity, we found that antibody treatment efficiently inhibited induction of the TGF- $\beta$  transcriptional targets *Tgfb1*, *Pail1*, *Ctgf* and *Coll1a1* (Supplementary Fig. 4g). Losartan treatment reduced BP in control mice, as expected (Supplementary Fig. 4f). These results support the conclusion that TGF- $\beta$  pathway activation is secondary to aortic dilation, elastolysis and fibrosis in *Adamts1*-related aortopathy during disease onset.

#### Aortopathy induced by *Adamts1* deficiency is mediated by Nos2-derived nitric oxide

To further investigate the mechanism of *Adamts1*-related aortopathy, we focused on potential mediators of the hypotension induced by *Adamts1* deficiency, because hypotension was the earliest effect that was detected after *Adamts1* silencing. A candidate factor is nitric oxide (NO), an endogenous vasorelaxant that relaxes smooth muscle and lowers BP. NO can be produced by the constitutively expressed NO synthase (NOS) of endothelial (eNOS; also called NOS3) or neuronal (nNOS; also called NOS1) origin or by inducible NOS (iNOS; also called NOS2)<sup>24</sup>. To test the contribution of NO to the induction of aortic dilation, we treated C57BL/6 mice with *N*<sub>G</sub>-nitro-L-arginine-methylester (L-NAME), an inhibitor of all NOS enzymes (Fig. 4a). Despite its hypertensive effect (Supplementary Fig. 5a), L-NAME treatment prevented siAdamts1-induced dilation of the AsAo and the AbAo (Fig. 4b), blocked elastolysis (Fig. 4c and Supplementary Fig. 5b), decreased fibrosis (Fig. 4d) and prevented Mmp9 activation (Fig. 4e).

To further test the therapeutic potential of NOS activity inhibition, we administered L-NAME to *Adamts1*<sup>+/-</sup> mice. L-NAME treatment rapidly decreased the AsAo and AbAo diameters to normal levels (Fig. 4f), increased BP (Fig. 4g and Supplementary Fig. 5c), decreased elastic fiber fragmentation (Fig. 4h) and diminished fibrosis (Fig. 4i).

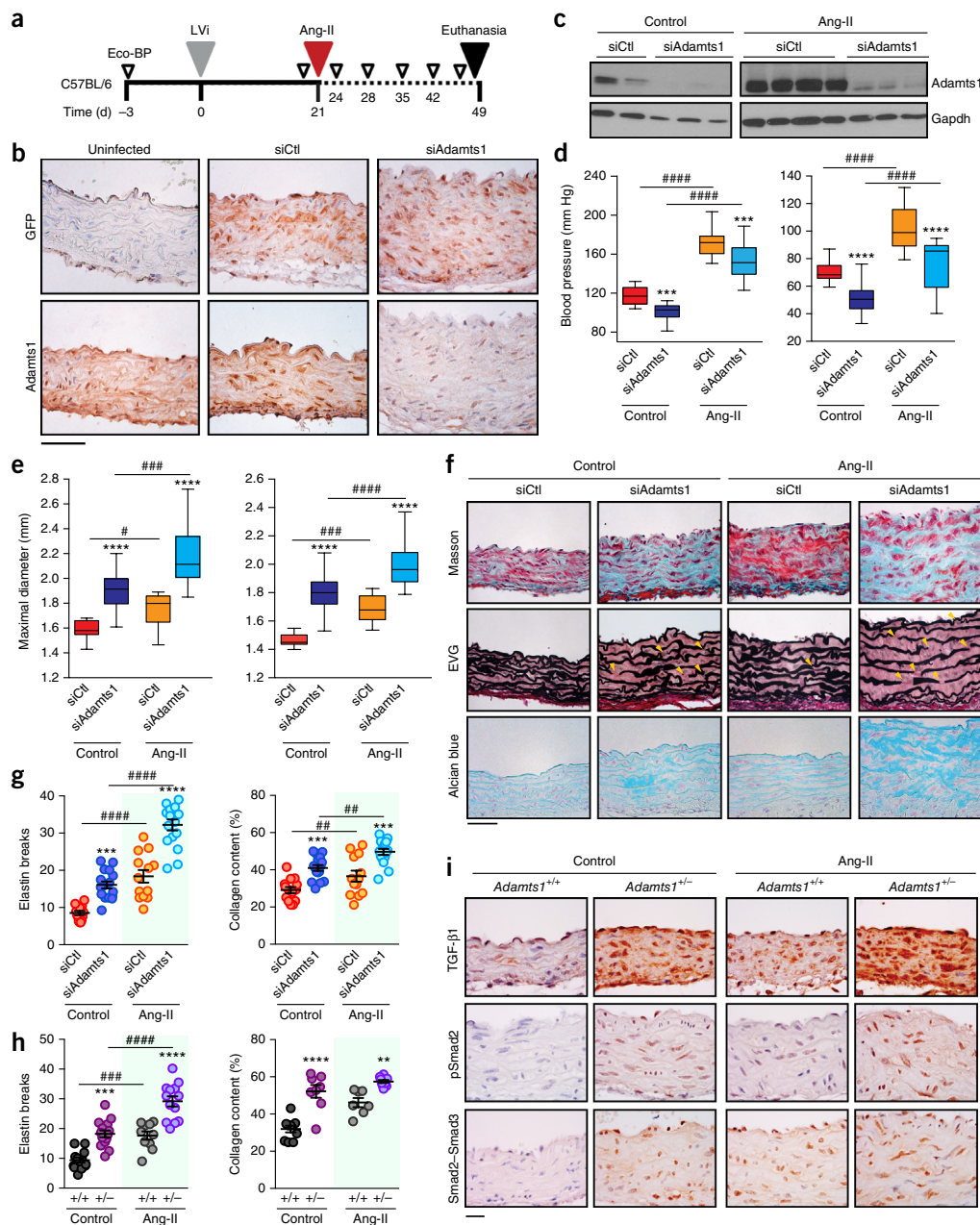
Under physiological conditions, vascular NOS3 produces low levels of NO to maintain vascular homeostasis<sup>25</sup>, whereas under pathological conditions NOS2 can be transcriptionally activated and can produce 1,000-fold more NO than its constitutively active counterparts<sup>26</sup>. We therefore hypothesized that *Nos2* levels might be increased in *Adamts1*-deficient mice and that high *Nos2* levels could mediate aortic dilation and medial degeneration. *Nos2* mRNA expression was markedly induced as early as 2 d after inoculation with the

**Figure 2** Knockdown of *Adamts1* expression in the aorta of adult mice causes an aortic disease similar to that induced by genetic deficiency of *Adamts1*. (a) Experimental design. 8-week-old C57BL/6 mice were inoculated (through the jugular vein) with lentivirus encoding GFP and either siCtl or siAdamts1. Eco-BP (ultrasound and BP analysis) was performed seven times (empty triangles). LVi, lentivirus inoculation; Ang-II, Ang-II minipump implantation. (b) Representative images of GFP (top) and *Adamts1* (bottom) immunostaining in AsAo sections of uninfected (left), siCtl-expressing (middle) or siAdamts1-expressing (right) mice ( $n = 4$  mice per group). Scale bar, 50  $\mu$ m. (c) Immunoblot analysis for *Adamts1* expression in aortic samples from mice that were transduced with lentivirus expressing the indicated siRNA and treated with vehicle (control) or Ang-II as indicated. Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (Gapdh) was used as a loading control. Each lane corresponds to an individual mouse. (d,e) End-of-treatment systolic (left) and diastolic (right) BP (d) and maximal AR (left) and AsAo (right) diameter (e) in control-treated siCtl-expressing mice ( $n = 14$ ), control-treated siAdamts1-expressing mice ( $n = 16$ ), Ang-II-treated siCtl-expressing mice ( $n = 13$ ) and Ang-II-treated siAdamts1-expressing mice ( $n = 16$ ). Data are presented as box-and-whisker plots, with 75th and 25th percentiles, and are pooled from two independent experiments; bars represent maximal and minimal values. \*\*\* $P < 0.01$ , \*\*\*\* $P < 0.001$  (siCtl versus siAdamts1); # $P < 0.05$ , ### $P < 0.001$ , #### $P < 0.0001$  (control versus Ang-II treatment); by two-way ANOVA. (f) Representative images showing Masson's trichrome (Masson) (top), elastic van Gieson (EVG) (middle) and Alcian blue (bottom) staining in the AsAo from the indicated mice ( $n = 4$  mice per group). Yellow arrowheads indicate elastin breaks. Scale bar, 50  $\mu$ m. (g,h) Quantification of elastin breaks (left) and collagen content (right) in AsAo sections from the mouse cohorts shown in d,e (g) and in Figure 1c (h). \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$  (siCtl versus siAdamts1 or *Adamts1*<sup>+/-</sup> versus *Adamts1*<sup>+/-</sup> mice; # $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$ , #### $P < 0.0001$  (control- versus Ang-II-treated mice); by two-way ANOVA. (i) Representative images showing staining for TGF- $\beta$ 1 (top), phosphorylated Smad2 (pSmad2) (middle), and total Smad2 and Smad3 (bottom) in AsAo sections from control- or Ang-II-treated *Adamts1*<sup>+/-</sup> and *Adamts1*<sup>+/-</sup> mice ( $n = 3$  mice per group). Scale bar, 20  $\mu$ m.

## ARTICLES

siAdams1-expressing lentivirus, whereas *Nos3* mRNA expression was unaffected (Supplementary Fig. 5d). mRNA levels of endothelin 1 (*Edn1*), which encodes another BP regulator, was not affected by *Adams1* silencing (Supplementary Fig. 5d). Immunostaining of aortic cross-sections from siAdams1-expressing or *Adams1*<sup>+/-</sup> mice confirmed increased *Nos2* levels in the medial layer, which coincided with SMA-positive VSMCs, as compared to that in the aorta of their respective controls (Fig. 5a).

To investigate whether *Nos2*-derived NO mediates the aortopathy that is induced by an *Adams1* deficiency, we inoculated *Nos2*<sup>+/+</sup> and *Nos2*<sup>-/-</sup> mice with the siAdams1-expressing lentivirus (Fig. 5b). *Nos2* deficiency blocked siAdams1-induced AsAo and AbAo dilation (Fig. 5c and Supplementary Fig. 5e), elastic fiber fragmentation (Fig. 5d and Supplementary Fig. 5f) and fibrosis (Fig. 5e). *Nos2*<sup>-/-</sup> mice were normotensive and resistant to the hypotensive effects of *Adams1* silencing (Fig. 5f and Supplementary Fig. 5g). Consistent



with there being a critical role for Nos2-derived NO in Adamts1-deficiency-induced aortopathy, unfixed aortic sections from siAdamts1-expressing or *Adamts1*<sup>+/-</sup> mice contained higher NO levels than their respective controls (Fig. 5g). Moreover, this siAdamts1-induced increase in aortic NO levels was not observed in *Nos2*<sup>-/-</sup> mice (Fig. 5g).

Because the kinase Akt is a mediator of Nos2 induction<sup>27</sup> and is activated by syndecan 4, a known proteolytic Adamts1 target<sup>28</sup>, we investigated the contribution of Akt to Nos2 induction in Adamts1-deficient mice. The levels of phosphorylated Akt, a marker of Akt activation, were increased in protein extracts from the aorta of siAdamts1-expressing mice relative to those in siCtrl-expressing mice (Fig. 5h). Moreover, NF-κB, a critical transcription factor for Nos2 induction<sup>29</sup>, was activated following *Adamts1* silencing, as indicated by increased levels of phosphorylated p65, an NF-κB subunit (Fig. 5h). Transduction of cultured VSMCs *in vitro* with the siAdamts1-expressing lentivirus induced Akt and NF-κB activation, as well as Akt-dependent Nos2 expression, (Supplementary Fig. 5h–j) and increased the levels of NO-derived metabolites and NO (Supplementary Fig. 5k,l). Finally, pharmacological inhibition of Akt activation in *Adamts1*<sup>+/-</sup> mice, using the mechanistic target of rapamycin (mTOR) inhibitor AZD8055, rapidly decreased aortic dilation to normal levels, inhibited NO production in the aortic wall and reduced *Nos2* levels (Fig. 5i–l). Taken together, these results strongly suggest that Akt activation mediates Nos2 induction in the dilated aortic wall.

### A critical role for nitric oxide and Adamts1 in a mouse model of Marfan syndrome

We hypothesized that NO might mediate medial degeneration in other syndromic forms of TAA. To determine the potential role of NO in MFS, we administered L-NAME to *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> mice, a mouse model of MFS (also referred to as MFS mice) (Supplementary Fig. 6a). The phenotype of *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> mice resembles that of human MFS, including aortic dilation, aneurysm and dissection, and histological features of aortic medial degeneration<sup>18</sup>. Twelve-week-old *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> mice showed dilation of the AsAo and AbAo (Supplementary Fig. 6b), which was similar to the dilation observed in Adamts1-deficient mice. L-NAME treatment rapidly decreased the

AsAo and AbAo diameters to normal values (Supplementary Fig. 6b), augmented systolic and diastolic BP (Supplementary Fig. 6c), and diminished elastic fiber fragmentation (Supplementary Fig. 6d). There was no increase in collagen accumulation in *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> mice, and collagen content was unaffected by L-NAME treatment (Supplementary Fig. 6e).

*Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> mice also had markedly elevated levels of Nos2 and NO production relative to those in the littermate controls (Fig. 6a and Supplementary Fig. 7a), whereas *Nos3* levels were unaffected (Supplementary Fig. 7a). To determine whether Nos2 induction in these mice had a pathogenic role, we generated *Fbn1*<sup>C1039G/+;Nos2</sup><sup>-/-</sup> mice and found that the AsAo and AbAo diameters in these mice were markedly smaller than those in the *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> mice (Supplementary Fig. 7b).

The similarities between *Adamts1*<sup>+/-</sup> and *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> mice that we observed suggested a link between Adamts1 and the aortic pathology of *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> mice. Immunostaining of aortic sections from *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> mice revealed reduced levels of Adamts1 relative to those in the aortic sections from littermate controls (Fig. 6b), which was confirmed by immunoblot analysis of protein extracts derived from aorta (Fig. 6b). However, *Adamts1* mRNA levels were similar in *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> mice and control littermates (Fig. 6c), suggesting that post-transcriptional downregulation of *Adamts1* expression occurs in these mice.

Next we assessed the contribution of ADAMTS1 and NOS2 to MFS in humans. We found that ADAMTS1 expression in the medial layer of aortic sections from patients with MFS was decreased as compared to its expression in aortic sections from organ transplant donors, regardless of sex and age of the donors (Fig. 6d and Supplementary Fig. 7c). Quantification of the ADAMTS1-positive area in immunohistochemistry-stained sections confirmed a marked decrease in ADAMTS1 expression in the samples from the patients with MFS (hereafter referred to as MFS samples) (Fig. 6e). Moreover, autofluorescence of elastin was barely detectable in aortic sections from patients with MFS, and the autofluorescence showed a disorganized pattern (Fig. 6d). NOS2 expression, as determined by immunofluorescence, was higher in the medial layer of aortic sections for six of the eight subjects with MFS than that in the control subjects (Fig. 6d and Supplementary Fig. 7d), and the NOS2-positive area in aortic

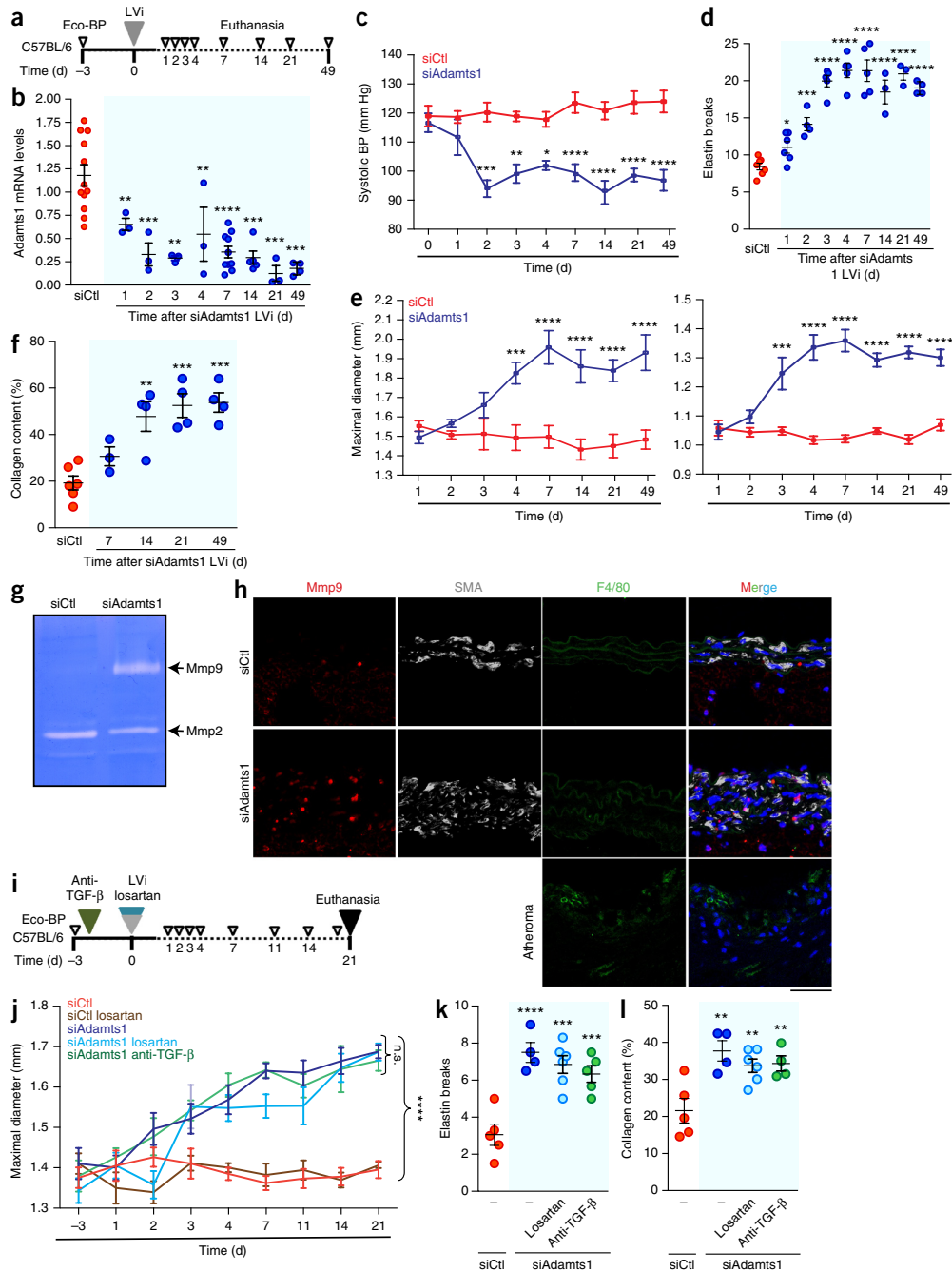
**Figure 3** Knockdown of *Adamts1* rapidly induces aortic dilation, hypotension and medial degeneration independently of TGF-β activation. (a) Experimental design. 8-week-old C57BL/6 mice were inoculated (through the jugular vein) with siCtrl- or siAdamts1-expressing lentivirus, monitored for aortic dilation and BP (Eco-BP), and euthanized at the indicated time points (open triangles) immediately after Eco-BP was performed. (b) *Adamts1* mRNA expression, as assessed by RT-qPCR, in extracts from the aorta of mice that were inoculated with lentivirus expressing the indicated siRNA and euthanized at the indicated time point after lentivirus inoculation (siCtrl: *n* = 12; siAdamts1: *n* = 3 mice per time point at days 1–4 and day 21, *n* = 10 at 7 d, and *n* = 4 day 49 after lentivirus inoculation). mRNA amounts were normalized to those of *Gapdh*. Data are means ± s.e.m. \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001, \*\*\*\**P* < 0.0001 (versus siCtrl-expressing mice); by one-way ANOVA. (c–f) Systolic BP (*n* = 12 mice per group) (c), elastin breaks in the AsAo (siCtrl: *n* = 7; siAdamts1: *n* = 6 (day 1), *n* = 4 (day 2), *n* = 5 (days 3, 4 and 7), *n* = 3 (days 14 and 21), *n* = 4 (day 49)) (d), maximal diameter of AsAo (left) and AbAo (right) (*n* = 12 mice per group) (e), and collagen content of the AsAo (siCtrl: *n* = 6; siAdamts1: *n* = 3 (day 7), *n* = 4 (days 14, 21 and 49)) (f) at the indicated time points in mice after inoculation of siCtrl- or siAdamts1-expressing lentivirus. Data are mean ± s.e.m. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001, \*\*\*\**P* < 0.0001 (versus siCtrl at the same time point); by repeated-measurements two-way ANOVA (c,e) or one-way ANOVA (d,f). (g) Representative zymogram analysis of Mmp2 and Mmp9 activity in aortic extracts prepared 4 d after transduction of mice with lentivirus expressing siCtrl or siAdamts1 (*n* = 3 mice per group). (h) Representative images of Mmp9 (red), SMA (white), and F4/80 (green) immunofluorescence, elastin autofluorescence (green) and DAPI-stained nuclei (blue) in aortic sections from mice 4 d after inoculation with siCtrl-expressing or siAdamts1-expressing lentivirus. Atheroma plaques in *ApoE*<sup>-/-</sup> mice that were fed a high-fat diet were used as a positive control for F4/80 staining. Scale bar, 50 μm. (i) Experimental scheme. One group of mice received an intraperitoneal injection of a TGF-β-specific neutralizing antibody 3 d before lentivirus inoculation, and antibody injections were repeated three times per week. A second group of mice was treated with losartan by osmotic minipump delivery beginning immediately before lentivirus inoculation. Mice were monitored for aortic dilation and BP at the indicated time points (open triangles). (j–l) Maximal AsAo diameter (j) and end-of-experiment quantification of elastin breaks (k) and collagen content (l) in aortic sections in the indicated experimental groups. In j, number of mice per group: siCtrl, *n* = 8; siCtrl, losartan, *n* = 4; siAdamts1, *n* = 5; siAdamts1, losartan, *n* = 7; and siAdamts1, anti-TGF-β, *n* = 6. In k,l, number of mice per group: siCtrl, *n* = 5; siAdamts1, *n* = 4; siAdamts1, losartan, *n* = 6; and siAdamts1, anti-TGF-β, *n* = 5. Data are mean ± s.e.m. \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001, \*\*\*\**P* < 0.0001 (versus siCtrl); n.s., not significant; by repeated-measurements two-way ANOVA of group means (j) or one-way ANOVA (k,l). In b,d,f, siCtrl results were stable throughout the experimental period, and the data shown are means of readings at days 2, 4, 7, 14, 21 and 49.

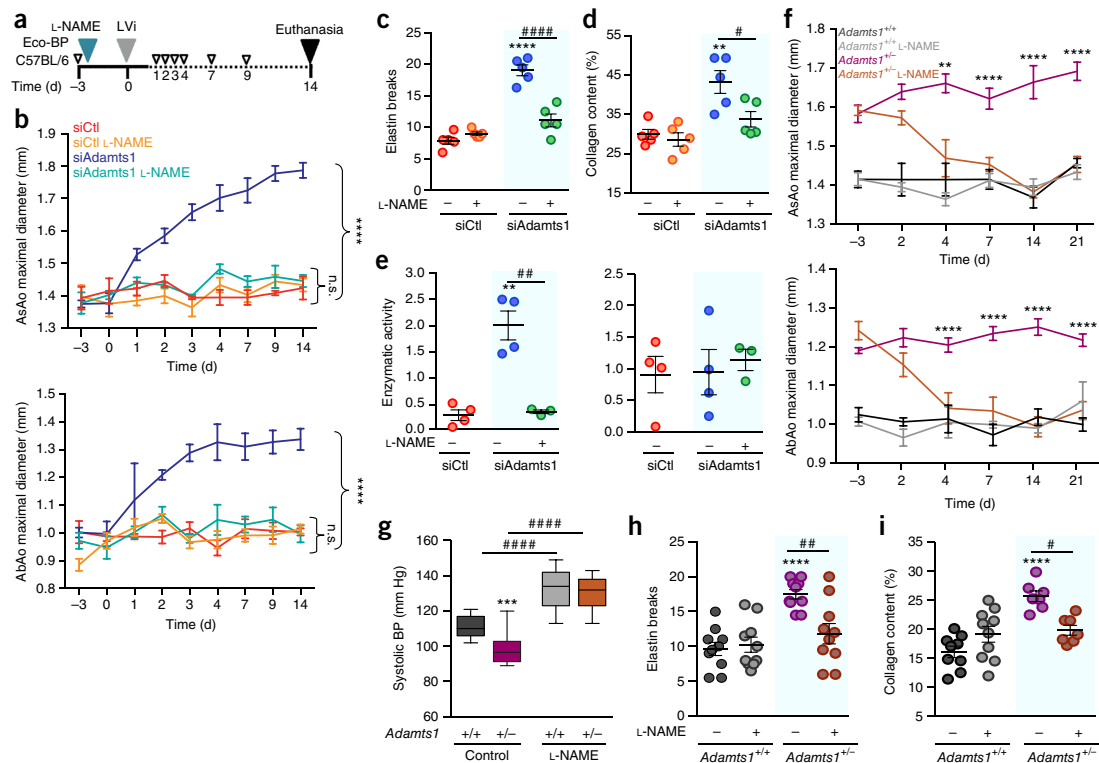
ARTICLES

sections was significantly greater in the MFS samples (Fig. 6f). Of note, aortic NOS2 expression in the MFS samples was in the VSMCs, as assessed by SMA staining (Supplementary Fig. 7e).

Because L-NAME treatment increases BP, probably through its inhibition of Nos3, it is unsuitable for the long-term treatment of individuals with TAA. To investigate whether drugs that target only

the inducible NOS isoform might be of therapeutic interest for syndromic TAA, we tested the effects of 1400W, a potent and highly specific inhibitor of NOS2 (ref. 30). First, we found that 1400W treatment of cultured VSMCs that had been transduced with the siAdamts1-expressing lentivirus blocked production of NO and nitrites relative to that in cells that were not treated with 1400W





**Figure 4** The aortopathy induced by *Adamts1* deficiency is mediated by NO. (a) Experimental design. 8-week-old C57BL/6 mice were treated with the NOS inhibitor L-NAME (in the drinking water) starting 3 d before inoculation with the siCtrl- or siAdamts1-expressing lentivirus and continuing for the next 14 d. (b) Maximal AsAo and AbAo diameters at the indicated time points before or after lentivirus inoculation ( $n = 5$  mice per group). (c, d) End-of-experiment quantification of elastin breaks (c) and collagen content (d) in aortic sections from the mice treated as indicated ( $n = 5$  mice per group). (e) Mmp9 (left) and Mmp2 (right) activity in aortic extracts from mice that were treated as indicated (number of mice per group: siCtrl,  $n = 4$ ; siAdamts1,  $n = 4$ ; siAdamts1, L-NAME,  $n = 3$ ). In b–e, data are mean  $\pm$  s.e.m.  $**P < 0.01$  and  $****P < 0.0001$  (versus untreated siCtrl);  $\#P < 0.05$ ,  $\#\#P < 0.01$ ,  $\#\#\#P < 0.0001$  and n.s., not significant; by repeated-measurements two-way ANOVA of group means (b), two-way ANOVA (e). (f–i) Maximal AsAo (top) and AbAo (bottom) diameters at the indicated time points (f), end-of-experiment quantification of systolic BP (g), elastin breaks (h) and collagen content (i) in 8-week-old *Adamts1*<sup>+/+</sup> (+/+) and *Adamts1*<sup>+/-</sup> (+/-) mice that were treated with L-NAME for 21 d or left untreated. In f, g,  $n = 12$  *Adamts1*<sup>+/+</sup> mice,  $n = 13$  L-NAME-treated *Adamts1*<sup>+/+</sup> mice,  $n = 14$  *Adamts1*<sup>+/-</sup> mice,  $n = 12$  L-NAME-treated *Adamts1*<sup>+/-</sup> mice. In h, i,  $n = 9$  *Adamts1*<sup>+/+</sup> mice,  $n = 10$  L-NAME-treated *Adamts1*<sup>+/+</sup> mice,  $n = 7$  *Adamts1*<sup>+/-</sup> mice,  $n = 7$  L-NAME-treated *Adamts1*<sup>+/-</sup> mice. Data are mean  $\pm$  s.e.m., except in g, where data are presented as box-and-whisker plots, with 75th and 25th percentiles; bars represent maximal and minimal values. In f,  $***P < 0.001$  and  $****P < 0.0001$  (versus L-NAME-treated *Adamts1*<sup>+/-</sup> mice at each time point); by repeated-measurements two-way ANOVA. In g–i,  $***P < 0.001$ ,  $****P < 0.0001$  (*Adamts1*<sup>+/+</sup> versus *Adamts1*<sup>+/-</sup>);  $\#P < 0.05$ ,  $\#\#P < 0.01$ ,  $\#\#\#P < 0.0001$  (L-NAME-treated versus control); by two-way ANOVA.

(Supplementary Fig. 5k,l). Next we treated 12-week-old *Adamts1*<sup>+/-</sup> or *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> mice for 16 weeks with 1400W. This treatment led to a rapid decrease in AsAo and AbAo diameters to normal levels, which was maintained throughout the treatment period (Fig. 6g and Supplementary Fig. 8a). The efficacy of 1400W treatment in reducing aortic dilation was confirmed by *ex vivo* measurements of the AsAo and AbAo diameters (Supplementary Fig. 8b). Notably, 1400W treatment did not raise BP above the normotensive values found in untreated littermate controls (Fig. 6h and Supplementary Fig. 8c) and did not have obvious detrimental effects on the health of these mice (data not shown). Histological analysis of aortic cross-sections showed that 1400W treatment led to an almost complete regression of elastic fiber fragmentation (Fig. 6i and Supplementary Fig. 8d,e). To determine whether NOS2 inhibition was also effective in older mice, we treated 9-month-old *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> mice with 1400W. This treatment led to a rapid decrease in aortic diameter to normal

levels (Fig. 6j and Supplementary Fig. 8f), with no increase in BP (Fig. 6k). Taken together, these data support the idea that ADAMTS1 and NOS2 might be important mediators of the aortic pathology in human MFS and warrant evaluation of NOS2 inhibitors for the treatment of syndromic TAA.

**DISCUSSION**

This study identifies NO as an essential mediator of syndromic aortic disease in mouse models and suggests NO production as a possible target for intervention in human aortopathies. In addition, we show that Adamts1 is an important mediator of vascular wall homeostasis and that its expression is decreased in individuals with MFS. The resemblance of the aortopathy in *Adamts1*-deficient mice to human syndromic FTAAD suggests that ADAMTS1 downregulation in MFS may underlie the aortic phenotype of patients with MFS. The extent of aortic dilatation was similar in young *Adamts1*-deficient and in

## ARTICLES

young MFS mice, and elastic fibers were severely compromised in both mouse models. Aneurysms did not develop in young *Adamts1*-deficient or MFS mice, but administration of the hypertensive factor Ang-II to *Adamts1*-deficient mice for less than 1 month induced aneurysms in nearly 80% of mice and lethal aortic dissections in nearly 50% of mice. We suggest that the aortic dilation and medial degeneration induced by *Adamts1* deficiency resembles the early stages of human aortic diseases, whereas the exacerbated aortic pathology induced by Ang-II treatment mimics later disease stages, when aortic pathology is worsened by age-related hypertension.

Because ADAMTS1 levels are upregulated by Ang-II (ref. 10), we hypothesized that ADAMTS1 would be an important mediator of Ang-II-induced aortic disease. However, instead of having protective effects on the aortic wall, a partial *Adamts1* deficiency caused pathological remodeling of the aortic wall, indicating a homeostatic role for *Adamts1*. Previous studies of other strains of *Adamts1*-deficient mice did not report vascular defects<sup>15,31,32</sup>. It will therefore be of interest to investigate the aortic phenotype in the previously reported strains of *Adamts1*-mutated mice and to determine whether the different genetic backgrounds in these strains (pure C57BL/6 background used in our study, as compared to the mixed genetic background used in earlier studies) account for the observed differences in lethality and fertility.

Mutations in genes encoding several members of the ADAMTS and ADAMTS-like (ADAMTSL) family that are implicated in microfibril formation have been linked to connective tissue disorders without an aortic phenotype<sup>33</sup>. These disorders are similar to those produced by mutation of *FBN1*, which encodes fibrillin 1, the major microfibril component of tissue<sup>34</sup>, suggesting that interaction of ADAMTS proteins with fibrillins may be crucial to the regulation of connective tissue homeostasis. Given our results, an attractive idea is that *FBN1* mutations that are linked to MFS might disrupt *FBN1* domains required for interaction with ADAMTS1; in such a scenario, loss of this interaction could destabilize ADAMTS1, thus explaining its low levels in patients with MFS and the shared features of *Adamts1*<sup>+/-</sup> and MFS mice.

We previously reported that lentivirus tropism depends on the route of administration<sup>35</sup> and that injection of lentivirus into the jugular vein yields stable and efficient transduction of the aortic wall<sup>20</sup>. This approach achieved long-term silencing of *Adamts1*

throughout the aorta and resulted in aortic phenotypic changes and symptoms indistinguishable from those of *Adamts1*<sup>+/-</sup> mice. By inducing knockdown at a specific time point, we were able to define the pathological sequence leading to disease—transduction of the si*Adamts1*-expressing lentivirus triggered immediate hypotension and elastolysis, which was followed rapidly by aortic dilation; in contrast, activation of the TGF- $\beta$ -Smad pathway did not occur until 1–2 weeks after lentiviral infection.

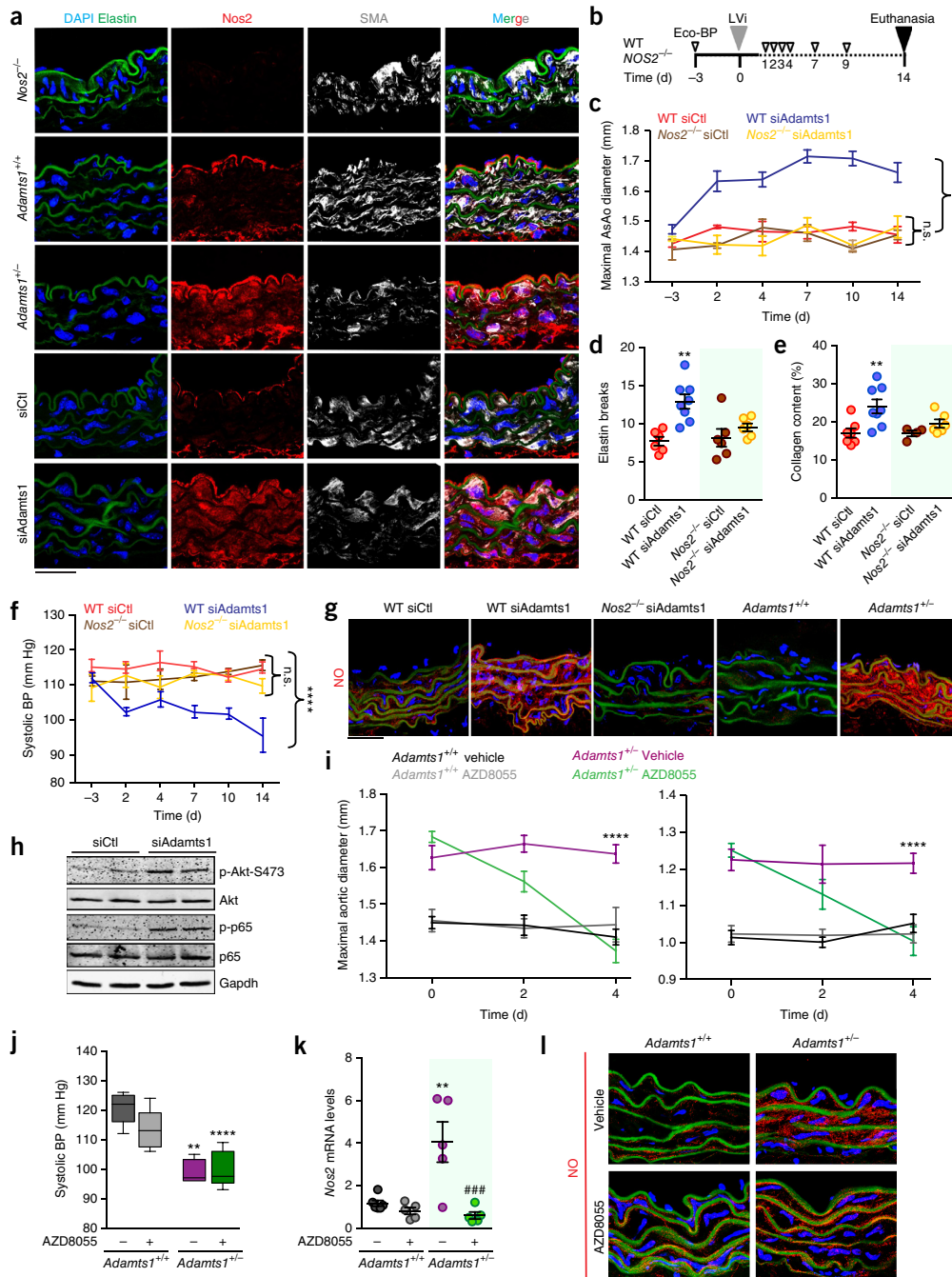
Although aortic medial degeneration and dilation are associated with activation of the TGF- $\beta$  and Ang-II pathways in syndromic and nonsyndromic aortic disease<sup>4,17,21,36</sup>, blockade of these pathways had no significant effects on si*Adamts1*-mediated aortic dilation, medial degeneration or hypotension, at least in the first 2 weeks after *Adamts1* knockdown. Our data are nonetheless compatible with a role for these pathways at later disease stages. Similarly, TGF- $\beta$  neutralization failed to inhibit aneurysm progression at the early stages of a progressively severe form of MFS (in *Fbn1*<sup>mgR/mgR</sup> mice, which are hypomorphic for fibrillin 1 expression), but it was protective at later stages<sup>37</sup>.

Although hypertension is considered to be a risk factor in AA, we found that L-NAME administration was able to reverse aortic dilation in *Adamts1*<sup>+/-</sup> and MFS mice despite its hypertensive effects. Reversal of dilation by L-NAME treatment was remarkably fast: as it was complete in 1 week. Elastic fiber integrity and collagen deposition in *Adamts1*<sup>+/-</sup> mice returned to normal levels 3 weeks after L-NAME administration, suggesting that NO inhibition leads to activation of mechanisms for collagen clearance from the aortic wall and induction of elastin synthesis. NO is a critical regulator of smooth muscle cell contractility; therefore, in view of the rapid dilation observed after *Adamts1* knockdown and the rapid regression of aortic diameter after treatment with NO inhibitors, we propose that aortic dilation is strongly dependent on smooth muscle cell contractility and that structural changes in the aorta are a secondary consequence of this dysregulation of cell contractility. Our results suggest that increased NO production is a primary trigger of syndromic aortic disease and that increased NO levels are also required for disease maintenance. Short-term treatment with NO donors, such as those used to treat angina, is unlikely to cause aortic damage; however, our findings indicate the need for caution in implementing long-term treatment with NO donors or with gene-therapy-augmented NOS expression.

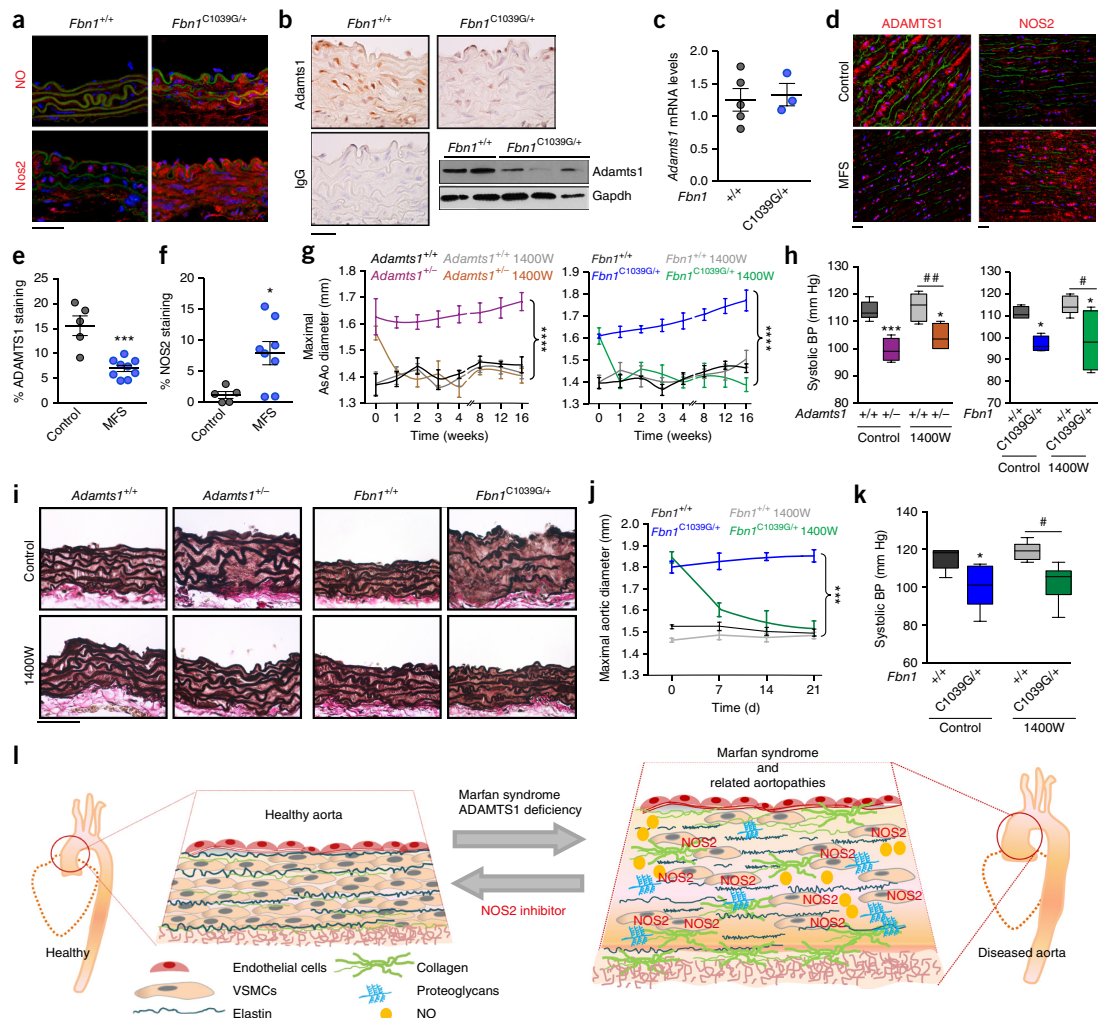
**Figure 5** *Nos2* is a critical mediator of the aortopathy induced by *Adamts1* deficiency. (a) Representative images of *Nos2* (red) and SMA (white) immunofluorescence, elastin autofluorescence (green) and DAPI-stained nuclei (blue) in aortic sections from 16-week-old *Nos2*<sup>-/-</sup>, *Adamts1*<sup>+/+</sup> and *Adamts1*<sup>+/-</sup> mice and from WT mice that were inoculated with siCtl- or si*Adamts1*-expressing lentivirus (4 d after inoculation) ( $n = 4$  mice per group). Scale bar, 50  $\mu\text{m}$ . (b) Experimental design. 8-week-old WT or *Nos2*<sup>-/-</sup> mice were inoculated with siCtl- or si*Adamts1*-expressing lentivirus and monitored for aortic dilation and BP. (c) Maximal AsAo diameter at the indicated time points (siCtl:  $n = 6$  WT mice;  $n = 4$  *Nos2*<sup>-/-</sup> mice; si*Adamts1*:  $n = 9$  WT mice;  $n = 7$  *Nos2*<sup>-/-</sup> mice). (d,e) End-of-experiment quantification of elastin breaks (d) and collagen content (e) in the same groups of mice as in c. Each symbol represents an individual mouse. (f) Systolic BP at the indicated time points in the same cohorts of mice as in c. In c–f, data are mean  $\pm$  s.e.m. In c,f, \*\*\*\* $P < 0.0001$  and n.s., not significant (versus those in si*Adamts1*-expressing *Nos2*<sup>-/-</sup> mice); by repeated-measurements two-way ANOVA of group means. In d,e, \*\* $P < 0.01$  and n.s., not significant (versus those in siCtl-expressing WT mice); by two-way ANOVA. (g) Representative images of NO production (red), elastin autofluorescence (green) and DAPI-stained nuclei (blue) in unfixed aortic tissue sections from WT and *Nos2*<sup>-/-</sup> mice that were treated as indicated 14 d after lentivirus inoculation and from 10-week-old *Adamts1*<sup>+/+</sup> and *Adamts1*<sup>+/-</sup> mice ( $n = 3$  mice per group). Scale bar, 50  $\mu\text{m}$ . (h) Representative immunoblot analysis of total and phosphorylated Akt and p65 in aortic extracts of WT mice treated with siCtl- or si*Adamts1*-expressing lentivirus ( $n = 5$  mice per group). Each lane represents one mouse. (i–l) Maximal AsAo (left) and AbAo (right) diameters at the indicated time points (i), end-of-experiment systolic BP (j), *Nos2* mRNA levels in aortic extracts, as assessed by RT-qPCR, (k), and representative images of NO production (red), elastin autofluorescence (green) and DAPI-stained nuclei (blue) in unfixed aortic tissue sections (l) of 8-week-old *Adamts1*<sup>+/+</sup> and *Adamts1*<sup>+/-</sup> mice that received daily intraperitoneal injections of the mTOR–Akt inhibitor AZD8055 or vehicle control for 4 d. Scale bar, 50  $\mu\text{m}$ . In i,j, numbers of mice per group:  $n = 5$  control *Adamts1*<sup>+/+</sup> mice,  $n = 6$  AZD8055-treated *Adamts1*<sup>+/+</sup> mice,  $n = 4$  control *Adamts1*<sup>+/-</sup> mice,  $n = 7$  AZD8055-treated *Adamts1*<sup>+/-</sup> mice; in k,  $n = 5$  mice per group; in l,  $n = 4$  mice per group. Data are mean  $\pm$  s.e.m. except in j, where data are presented as box-and-whisker plots, with 75th and 25th percentiles; bars represent maximal and minimal values. \*\* $P < 0.01$  and \*\*\*\* $P < 0.0001$  (versus untreated *Adamts1*<sup>+/+</sup>); ### $P < 0.001$  (versus untreated *Adamts1*<sup>+/-</sup>); by repeated-measurements two-way ANOVA (i) or two-way ANOVA (k).

A recent report showed that gain-of-function mutations in *PRKG1*—which encodes PKG1, a downstream target of NO—are present in four families affected by TAA<sup>38</sup>. Increased PKG1 activity was shown to promote activation of the myosin regulatory light chain phosphatase and was, thus, predicted to decrease VSMC contractility<sup>38</sup>. These findings

suggest that NO might also be an essential factor in nonsyndromic, familial TAAD. A critical role of the NO signaling pathway in maintaining VSMC contractility is consistent with the association of familial TAAD with mutations in other genes involved in the regulation of the VSMC contractile unit, including genes encoding aortic



ARTICLES



**Figure 6** Adamts1 and NO have critical roles in Marfan syndrome. (a) Representative images of NO production (red; top), Nos2 immunofluorescence (red; bottom), elastin autofluorescence (green) and DAPI-stained nuclei (blue) in aortic sections of 16-week-old WT (left) and *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> (right) mice (*n* = 3 mice per group). (b) Representative images for Adamts1 expression, as assessed by immunohistochemistry, in aortic sections from WT and *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> mice (*n* = 4 mice per group) and immunoblot analysis for Adamts1 expression in aortic extracts, in which each lane represents one mouse (bottom right). IgG staining served as a negative control. Scale bar, 20  $\mu$ m. (c) *Adamts1* mRNA levels, relative to *Gapdh* levels, in aortic extracts from WT (*n* = 6) and *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> (*n* = 3) mice, as assessed by RT-qPCR. Data are means  $\pm$  s.e.m. (d) Representative images of ADAMTS1 immunofluorescence (red; *n* = 9 subjects per group) and NOS2 immunofluorescence (red; *n* = 6 subjects per group) in the medial layer of aortic sections from control donors or patients with MFS. Elastin autofluorescence (green) and DAPI-stained nuclei (blue) are also shown. Scale bars, 25  $\mu$ m. (e) Percentage of ADAMTS1-positive area in immunohistochemistry-stained sections of aortas from control donors (*n* = 5) and patients with MFS (*n* = 9). (f) Percentage of NOS2-positive area in aortic sections from control donors (*n* = 5) and patients with MFS (*n* = 8). In e,f, data are means  $\pm$  s.e.m. \**P* < 0.05, \*\*\**P* < 0.001; by Student's *t*-test. (g–i) Maximal AsAo diameter at the indicated time points in the groups of mice indicated (*n* = 4 mice per group) (g), end-of-experiment systolic BP (*n* = 4 mice per group) (h) and representative images of EVG staining in aortic sections (same cohorts of mice as in g) (i) from 12-week-old *Adamts1*<sup>+/-</sup> and *Fbn1*<sup>+/-C1039G</sup> mice and their corresponding WT littermates after treatment with 1400W (in the drinking water) for 16 weeks. Data are means  $\pm$  s.e.m. In g, \*\*\**P* < 0.0001 and n.s., not significant (versus 1400W-treated *Adamts1*<sup>+/-</sup> or *Fbn1*<sup>+/-C1039G</sup> mice); by repeated-measurements two-way ANOVA of group means. In h, data are presented as box-and-whisker plots, with 75th and 25th percentiles; bars represent maximal and minimal values. \**P* < 0.05 and \*\*\**P* < 0.001 (versus WT control); #*P* < 0.05 and ##*P* < 0.01 (versus 1400W-treated *Adamts1*<sup>+/-</sup> 1400W or *Fbn1*<sup>+/-</sup> mice); by two-way ANOVA. Scale bar, 50  $\mu$ m (i). (j,k) Maximal AsAo diameter at the indicated time points (j) and end-of-experiment systolic BP (k) in 36-week-old *Fbn1*<sup>+/-C1039G</sup> mice and their WT littermates treated with 1400W in the drinking water for 21 d (*n* = 5 control or 1400W-treated WT mice; *n* = 7 control *Fbn1*<sup>+/-C1039G</sup> mice; *n* = 6 1400W-treated *Fbn1*<sup>+/-C1039G</sup> mice). Data are means  $\pm$  s.e.m. (j) or box-and-whisker plots, with 75th and 25th percentiles; bars represent maximal and minimal values (k). \*\*\**P* < 0.001 (versus 1400W-treated *Fbn1*<sup>+/-C1039G</sup> mice); \**P* < 0.05 (versus control WT); #*P* < 0.05 (versus treated WT); by repeated-measurements two-way ANOVA of group means (j) or two-way ANOVA (k). (l) Model depicting the contribution of NO and NOS2 to the aortic phenotype in Marfan syndrome and the related aortopathy induced by ADAMTS1 deficiency.

smooth muscle actin (ACTA2), myosin heavy chain 11 (MYH11) and myosin light chain kinase (MYLK)<sup>39</sup>. It will be important to determine whether dysregulation of the NO pathway also contributes to the aortic disease associated with these mutations.

Several substrates, such as aggrecan, versican, syndecan 4, semaphorin 3C, nidogen 1, nidogen 2 and desmocollin 3, are proteolytically degraded by ADAMTS1 (ref. 40) and are therefore candidate mediators of its vascular homeostatic functions. The accumulation of any of these substrates in Adamts1-deficient tissues might contribute to the pathogenesis caused by Adamts1 insufficiency. Indeed, high levels of syndecan 4 lead to activation of Akt<sup>28</sup>, a kinase known to activate NF- $\kappa$ B<sup>41</sup>. Akt and NF- $\kappa$ B are known mediators of NOS2 induction<sup>28,29</sup>, and we found that both Akt and NF- $\kappa$ B are activated early after *Adamts1* knockdown in both aortic tissue and cultured VSMCs, concomitantly with Nos2 induction. We therefore propose that Akt and NF- $\kappa$ B could mediate Nos2 induction elicited by Adamts1 insufficiency. Accordingly, we found that pharmacological inhibition of mTOR-Akt in *Adamts1*<sup>+/-</sup> mice rapidly decreased Nos2 levels and NO production in the aortic wall and regressed aortic dilation. Although mTOR-Akt inhibitors could be considered as alternative therapeutic agents for the treatment of aortic dilation, mTOR and Akt are upstream components of many signaling pathways, including those regulating cell survival. Further analysis of the long-term effects of such inhibitors will be required before considering them as therapeutic agents in aortic diseases.

We found that Mmp9 activation and elastin fragmentation in the aorta of *Adamts1*-deficient mice were sensitive to NOS inhibition, suggesting that increased NO levels induce Mmp9-dependent elastin fragmentation and initiate medial degeneration. Although we cannot exclude the involvement of other proteinases in the elastolysis of pathological aortic dilation, Mmp9 is an important elastolytic metalloproteinase and a target of NO regulation<sup>42,43</sup>. Early activation of Mmp9, but not Mmp2, occurred after *Adamts1* silencing, a pattern of metalloproteinase activation characteristic of infiltrating macrophages in aortic dissection<sup>22</sup>. However, because we found that Mmp9 is expressed in the medial layer by VSMCs and that macrophages are almost absent from this layer, we propose that VSMCs are a major source of Mmp9 in this context. These results are consistent with previous findings showing that inflammatory cells are scarce in aortas of patients with MFS<sup>44</sup>. Indeed, inflammation has been documented in only a small number of cases of human TAA<sup>45-47</sup>. Notably, two reports that found high ADAMTS1 levels in the aorta of patients with TAA also found inflammatory cells to be present in the vessel wall<sup>13,48</sup>, and high levels of ADAMTS1 were found in macrophages and neutrophils<sup>48</sup>. It thus seems likely that syndromic TAAD and inflammatory TAAD are associated with low and high ADAMTS1 levels, respectively, and are mechanistically distinct.

Previous reports implicating NO in mouse models of cerebral and abdominal AA (AAA) provide contradictory data; these discrepancies may be related to the use of pharmacological approaches versus targeted genetic-deletion approaches. For example, inhibitory or stimulatory roles for Nos2 have been reported in models of AAA<sup>49-53</sup>. In cerebral aneurysm, results with pharmacological inhibitors indicate that Nos2 is critical for disease development<sup>54</sup>; however, the incidence of cerebral aneurysm is similar in *Nos2*<sup>-/-</sup> and WT mice<sup>55</sup>. In our study, genetic analysis supports the results obtained with the pharmacological agents L-NAME and 1400W, a NOS2-specific inhibitor—*Nos2*<sup>-/-</sup> mice were resistant to siAdamts1-triggered aortopathy, and *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>; *Nos2*<sup>-/-</sup> mice showed no aortic dilation. The pathological role of NO in these models is thus mediated by Nos2, whose expression is induced as early as 2 d after *Adamts1* silencing.

Although Nos2 is not normally expressed in resting cells, once induced, it remains highly active<sup>24</sup>. We found high levels of Nos2 protein to be a consistent feature of aortopathy, occurring in two mouse models of *Adamts1* deficiency, in MFS mice and in aortic sections of patients with MFS. Taken together, our results suggest that NOS2-mediated NO production has an essential role in the aortopathy triggered by *Adamts1* deficiency and in the pathogenesis of MFS (Fig. 6I). Adamts1 protein levels were decreased in MFS mice and in patients with MFS, suggesting that these aortic diseases are linked mechanistically, and that loss of Adamts1 may partially or fully explain the aortic phenotype of MFS.

The current standard treatment for MFS,  $\beta$ -adrenergic blockers, slow aortic dilation but do not prevent dissection<sup>56</sup>. Treatment with the AT1R antagonist losartan ameliorated aortic growth and controlled TGF- $\beta$  pathway activation in mouse models of MFS<sup>5</sup>, raising high expectations for MFS therapy. However, several recent clinical trials show that the  $\beta$ -adrenergic blocker atenolol is equally, or more, effective than losartan in reducing aortic growth in individuals with MFS<sup>7-9,57</sup>. Although caution should be exercised in extrapolating conclusions obtained in mouse models to human disease, the powerful and extremely fast action of NOS2 inhibition in reversing aortopathies in mouse models warrants preclinical and clinical trials with drugs that target the NO pathway for the treatment of MFS and other aortic diseases. The Nos2 inhibitor 1400W was equally effective in young and relatively old MFS mice, suggesting that Nos2 mediates not only disease initiation, but also later disease progression. Considering that NOS2 inhibitors have been safely used in clinical trials for endotoxemia, rheumatoid arthritis and migraine (<https://clinicaltrials.gov/ct2/home> identifiers: NCT00184990, NCT00370435 and NCT00242866), our results point to NOS2-specific inhibitors as a promising alternative for the treatment of aortic disease that could be implemented with minimal delay.

## METHODS

Methods, including statements of data availability and any associated accession codes and references, are available in the [online version of the paper](#).

*Note: Any Supplementary Information and Source Data files are available in the online version of the paper.*

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank B. Ibañez and G. Egea for reagents, S. Bartlett for English language editing, A.G. Arroyo, S. Lamas, J. Alegre-Cebollada and J. Ruiz-Cabello for critical reading of the manuscript and advice, and S. Pocock and J. Vazquez for advice on statistics. We also thank the CNIC histology facility, C. Velasco, A.V. Alonso and L. Flores for technical support. CNIC is supported by the Spanish Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (MINECO) and the Pro-CNIC Foundation and is a Severo Ochoa Center of Excellence (MINECO award SEV-2015-0505). Support was also provided by grants from MINECO (grants SAF2013-45258P (M.R.C.), SAF2012-34296 (J.M.R.) and SAF2015-636333R (J.M.R.)), Fundación La Marato (TV3 grants 20151331 (J.M.R.) and 20151330 (A.E.)), CSIC (M.R.C.), the CIBERCV of Ministerio de Sanidad (grant CB16/11/00264; J.M.R.) and the Red de Investigación Cardiovascular (RIC) of Ministerio de Sanidad (grants RD12/0042/0022 (J.M.R.), RD12/0042/0021 (A.E.), RD12/0042/0024 (M.S.), RD12/0042/0056 (J.L.J.-B.) and RD12/0042/0018 (J.F.N.)), and by a Marie Skłodowska-Curie fellowship (E.J.R.) and FPI fellowships BES 2010-034552 (J.O.) and SVP-2013-067777 (S.V.). The cost of this publication has been paid in part with FEDER funds.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

M.R.C. and J.M.R. conceived the study; J.O., N.M.-B., M.R.C. and J.M.R. designed the study and analyzed the data; J.O. and N.M.-B. performed most of the experiments, with contributions from E.J.R., S.V., L.I.C., R.A. and N.L.-V.; L.J.J.-B. supervised and analyzed the echography analysis; M.R., J.D.B., M.A.H. and J.F.N.

## ARTICLES

provided human tissue samples; L.J.J.-B., M.R., A.M.B., M.A.H., D.M., A.E., M.S., J.F.N. and J.D.B. provided experimental support and ideas for the project; M.R.C. and J.M.R. wrote the manuscript with contributions from J.O. and N.M.-B. All authors read and approved the manuscript.

## COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare no competing financial interests.

Reprints and permissions information is available online at <http://www.nature.com/reprints/index.html>.

- Dietz, H.C. TGF- $\beta$  in the pathogenesis and prevention of disease: a matter of aneurysmic proportions. *J. Clin. Invest.* **120**, 403–407 (2010).
- Gallo, E.M. *et al.* Angiotensin-II-dependent TGF- $\beta$  signaling contributes to Loews-Dietz syndrome vascular pathogenesis. *J. Clin. Invest.* **124**, 448–460 (2014).
- Renard, M. *et al.* Novel MYH11 and ACTA2 mutations reveal a role for enhanced TGF- $\beta$  signaling in FTAAD. *Int. J. Cardiol.* **165**, 314–321 (2013).
- Gillis, E., Van Laer, L. & Loeys, B.L. Genetics of thoracic aortic aneurysms: at the crossroad of transforming-growth-factor- $\beta$  signaling and vascular smooth muscle cell contractility. *Circ. Res.* **113**, 327–340 (2013).
- Habashi, J.P. *et al.* Losartan, an AT1 antagonist, prevents aortic aneurysm in a mouse model of Marfan syndrome. *Science* **312**, 117–121 (2006).
- Lim, D.S. *et al.* Angiotensin II blockade reverses myocardial fibrosis in a transgenic mouse model of human hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* **103**, 789–791 (2001).
- Forteza, A. *et al.* Efficacy of losartan versus atenolol for the prevention of aortic dilation in Marfan syndrome: a randomized clinical trial. *Eur. Heart J.* **37**, 978–985 (2016).
- Lacro, R.V. *et al.* Atenolol versus losartan in children and young adults with Marfan's syndrome. *N. Engl. J. Med.* **371**, 2061–2071 (2014).
- Milleron, O. *et al.* Marfan Sartan: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Eur. Heart J.* **36**, 2160–2166 (2015).
- Oller, J. *et al.* C/EBP- $\beta$  and nuclear factor of activated T cells differentially regulate Adamts1 induction by stimuli associated with vascular remodeling. *Mol. Cell. Biol.* **35**, 3409–3422 (2015).
- Luque, A., Carpizo, D.R. & Iruela-Arispe, M.L. ADAMTS1 (METH1) inhibits endothelial cell proliferation by direct binding and sequestration of VEGF165. *J. Biol. Chem.* **278**, 23656–23665 (2003).
- Thai, S.N. & Iruela-Arispe, M.L. Expression of ADAMTS1 during murine development. *Mech. Dev.* **115**, 181–185 (2002).
- Ren, P. *et al.* ADAMTS1 and ADAMTS4 levels are elevated in thoracic aortic aneurysms and dissections. *Ann. Thorac. Surg.* **95**, 570–577 (2013).
- Sandy, J.D. *et al.* Versican V1 proteolysis in human aorta *in vivo* occurs at the Glu441–Ala442 bond, a site that is cleaved by recombinant ADAMTS1 and ADAMTS4. *J. Biol. Chem.* **276**, 13372–13378 (2001).
- Mittaz, L. *et al.* Adamts1 is essential for the development and function of the urogenital system. *Biol. Reprod.* **70**, 1096–1105 (2004).
- Cohn, R.D. *et al.* Angiotensin II type 1 receptor blockade attenuates TGF- $\beta$ -induced failure of muscle regeneration in multiple myopathic states. *Nat. Med.* **13**, 204–210 (2007).
- Neptune, E.R. *et al.* Dysregulation of TGF- $\beta$  activation contributes to pathogenesis in Marfan syndrome. *Nat. Genet.* **33**, 407–411 (2003).
- Pereira, L. *et al.* Pathogenetic sequence for aneurysm revealed in mice underexpressing fibrillin 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 3819–3823 (1999).
- Pyeritz, R.E. The Marfan syndrome. *Annu. Rev. Med.* **51**, 481–510 (2000).
- Esteban, V. *et al.* Regulator of calcineurin 1 mediates pathological vascular wall remodeling. *J. Exp. Med.* **208**, 2125–2139 (2011).
- Loeys, B.L. *et al.* A syndrome of altered cardiovascular, craniofacial, neurocognitive and skeletal development caused by mutations in *TGFBR1* or *TGFBR2*. *Nat. Genet.* **37**, 275–281 (2005).
- Wu, Z., Ruan, Y., Chang, J., Li, B. & Ren, W. Angiotensin II is related to the acute aortic dissection complicated with lung injury through mediating the release of MMP9 from macrophages. *Am. J. Transl. Res.* **8**, 1426–1436 (2016).
- Méndez-Barbero, N. *et al.* A major role for RCAN1 in atherosclerosis progression. *EMBO Mol. Med.* **5**, 1901–1917 (2013).
- Förstermann, U. & Sessa, W.C. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur. Heart J.* **33**, 829–837 (2012).
- Albrecht, E.W., Stegeman, C.A., Heeringa, P., Henning, R.H. & van Goor, H. Protective role of endothelial nitric oxide synthase. *J. Pathol.* **199**, 8–17 (2003).
- Pfeilschifter, J., Eberhardt, W. & Beck, K.F. Regulation of gene expression by nitric oxide. *Pflügers Arch.* **442**, 479–486 (2001).
- Tang, C.-H., Lu, D.-Y., Tan, T.-W., Fu, W.-M. & Yang, R.-S. Ultrasound induces hypoxia-inducible factor 1 activation and inducible nitric oxide synthase expression through the integrin–integrin-linked kinase–Akt–mammalian target of rapamycin pathway in osteoblasts. *J. Biol. Chem.* **282**, 25406–25415 (2007).
- Partovian, C., Ju, R., Zhuang, Z.W., Martin, K.A. & Simons, M. Syndecan 4 regulates subcellular localization of mTOR complex 2 and Akt activation in a PKC- $\alpha$ -dependent manner in endothelial cells. *Mol. Cell* **32**, 140–149 (2008).
- Kleinert, H., Schwarz, P.M. & Förstermann, U. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biol. Chem.* **384**, 1343–1364 (2003).
- Garvey, E.P. *et al.* 1400W is a slow, tight-binding and highly selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase *in vitro* and *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **272**, 4959–4963 (1997).
- Lee, N.V. *et al.* Fibulin 1 acts as a cofactor for the matrix metalloproteinase ADAMTS1. *J. Biol. Chem.* **280**, 34796–34804 (2005).
- Shindo, T. *et al.* ADAMTS1: a metalloproteinase–disintegrin essential for normal growth, fertility, and organ morphology and function. *J. Clin. Invest.* **105**, 1345–1352 (2000).
- Le Goff, C. & Cormier-Daire, V. The ADAMTS(L) family and human genetic disorders. *Hum. Mol. Genet.* **20**, R163–R167 (2011).
- Hubmacher, D. & Apte, S.S. Genetic and functional linkage between ADAMTS superfamily proteins and fibrillin 1: a novel mechanism influencing microfibril assembly and function. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**, 3137–3148 (2011).
- Escolano, A. *et al.* Specific calcineurin targeting in macrophages confers resistance to inflammation via MKP1 and p38. *EMBO J.* **33**, 1117–1133 (2014).
- Chen, X., Lu, H., Rateri, D.L., Cassis, L.A. & Daugherty, A. Conundrum of angiotensin II and TGF- $\beta$  interactions in aortic aneurysms. *Curr. Opin. Pharmacol.* **13**, 180–185 (2013).
- Cook, J.R. *et al.* Dimorphic effects of transforming-growth-factor- $\beta$  signaling during aortic aneurysm progression in mice suggest a combinatorial therapy for Marfan syndrome. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **35**, 911–917 (2015).
- Guo, D.C. *et al.* Recurrent gain-of-function mutation in *PRKGI* causes thoracic aortic aneurysms and acute aortic dissections. *Am. J. Hum. Genet.* **93**, 398–404 (2013).
- Karimi, A. & Milewicz, D.M. Structure of the elastin–contractile units in the thoracic aorta and how genes that cause thoracic aortic aneurysms and dissections disrupt this structure. *Can. J. Cardiol.* **32**, 26–34 (2016).
- Kelwick, R., Desanlis, I., Wheeler, G.N. & Edwards, D.R. The ADAMTS (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs) family. *Genome Biol.* **16**, 113 (2015).
- Dan, H.C. *et al.* Akt-dependent regulation of NF- $\kappa$ B is controlled by mTOR and raptor in association with IKK. *Genes Dev.* **22**, 1490–1500 (2008).
- O'Sullivan, S., Medina, C., Ledwidge, M., Radomski, M.W. & Gilmer, J.F. Nitric oxide–matrix metalloproteinase 9 interactions: biological and pharmacological significance—NO and MMP9 interactions. *Biochim. Biophys. Acta* **1843**, 603–617 (2014).
- Van Doren, S.R. Matrix metalloproteinase interactions with collagen and elastin. *Matrix Biol.* **44–46**, 224–231 (2015).
- Segura, A.M. *et al.* Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases and their inhibitors in thoracic aortic aneurysms and aortic valves of patients with Marfan's syndrome. *Circulation* **98**, II331–337; disc. II337–338 (1998).
- Biddinger, A., Rocklin, M., Coselli, J. & Milewicz, D.M. Familial thoracic aortic dilatations and dissections: a case control study. *J. Vasc. Surg.* **25**, 506–511 (1997).
- Girardi, L.N. & Coselli, J.S. Inflammatory aneurysm of the ascending aorta and aortic arch. *Ann. Thorac. Surg.* **64**, 251–253 (1997).
- Roth, M., Lemke, P., Bohle, R.M., Klovekorn, W.P. & Bauer, E.P. Inflammatory aneurysm of the ascending thoracic aorta. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **123**, 822–824 (2002).
- Gao, Y. *et al.* A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motif 1 (ADAMTS1) expression increases in acute aortic dissection. *Sci. China Life Sci.* **59**, 59–67 (2016).
- Johanning, J.M. *et al.* Nitric oxide in experimental aneurysm formation: early events and consequences of nitric oxide inhibition. *Ann. Vasc. Surg.* **16**, 65–72 (2002).
- Johanning, J.M., Franklin, D.P., Han, D.C., Carey, D.J. & Elmore, J.R. Inhibition of inducible nitric oxide synthase limits nitric oxide production and experimental aneurysm expansion. *J. Vasc. Surg.* **33**, 579–586 (2001).
- KuhlenCORD, P.J. *et al.* Accelerated atherosclerosis, aortic aneurysm formation and ischemic heart disease in apolipoprotein E and endothelial nitric oxide synthase double-knockout mice. *Circulation* **104**, 448–454 (2001).
- Lee, J.K., Borhani, M., Ennis, T.L., Upchurch, G.R. Jr. & Thompson, R.W. Experimental abdominal aortic aneurysms in mice lacking expression of inducible nitric oxide synthase. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **21**, 1393–1401 (2001).
- Zhang, J. *et al.* Inducible nitric oxide synthase is present in human abdominal aortic aneurysm and promotes oxidative vascular injury. *J. Vasc. Surg.* **38**, 360–367 (2003).
- Fukuda, S. *et al.* Prevention of rat cerebral aneurysm formation by inhibition of nitric oxide synthase. *Circulation* **101**, 2532–2538 (2000).
- Sadamasa, N., Nozaki, K. & Hashimoto, N. Disruption of gene for inducible nitric oxide synthase reduces progression of cerebral aneurysms. *Stroke* **34**, 2980–2984 (2003).
- Shores, J., Berger, K.R., Murphy, E.A. & Peyeritz, R.E. Progression of aortic dilatation and the benefit of long-term  $\beta$ -adrenergic blockade in Marfan's syndrome. *N. Engl. J. Med.* **330**, 1335–1341 (1994).
- De Backer, J. *et al.* Marfan syndrome and related heritable thoracic aortic aneurysms and dissections. *Curr. Pharm. Des.* **21**, 4061–4075 (2015).

## ONLINE METHODS

**Animal procedures.** Animal procedures were approved by the CNIC Ethics Committee and by the Madrid regional authorities (ref. PROEX 80/16), and conformed to EU Directive 2010/63EU and Recommendation 2007/526/EC regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes, enforced in Spanish law under Real Decreto 1201/2005. Overall mouse health was assessed by daily inspection for signs of discomfort, weight loss, or changes in behavior, mobility, and feeding or drinking habits. *Adamts1*<sup>+/-</sup> mice were obtained from the European Mouse Mutant Archive (EM:02291; B6;129P2-*Adamts1*<sup>tm1Dgen/H</sup>) and carried a  $\beta$ -galactosidase (*LacZ*)-neomycin cassette to replace the genomic sequence (c7784) between exons 1 and 2 in the *Adamts1* target allele. *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> mice<sup>58</sup>, which harbor a mutation in the *Fbn1* gene, and *Nos2*<sup>-/-</sup> mice<sup>59</sup> were obtained from Jackson Laboratories (JAX mice stock # 012885 and 007072, respectively). These three strains had been previously backcrossed to C57BL/6 mice for more than nine generations. All mice were genotyped by PCR of tail samples using the following primers: *Adamts1* mice (5'-GCCATCGGGTCAAGTGGACCTCG-3', 5'-GGGCCAGCTATTCTCCCACTCAT/GGTTGTAGTTTCGCGCTGAGTTTGG-3'); *Nos2*<sup>-/-</sup> mice (5'-ACATGCAGATGAGTACCGG-3', 5'-TCAACATCTCTGGTGAAC-3', 5'-AATATGCTCAAGTGGACCTCG-3'); *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> mice (5'-CTCATCA TTTTGGCCAGTTG-3', 5'-GCACCTGATGCACATTCACA-3'). Wild-type littermates were used as controls unless otherwise specified. Mice were treated with Ang-II (Sigma-Aldrich) at 1  $\mu$ g per kg body weight ( $\mu$ g/kg) per min or with losartan (Sigma-Aldrich) at 10 mg/kg/d using subcutaneous osmotic minipumps (Alzet Corp). The monoclonal pan-antibody against TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 and TGF- $\beta$ 3 (clone 1D11; BioXcell) was injected intraperitoneally three times per week at 10 mg/kg. *N<sub>o</sub>*-nitro-L-arginine methylester hydrochloride (L-NAME, Sigma-Aldrich, 0.5 g/liter) and 1400W (Tebu-bio, 0.1 g/liter) were supplied in drinking water for the indicated periods of time, plus an additional 3 d before lentivirus inoculation. AZD8055 (Selleckchem, S1555) was dissolved in 8% DMSO in corn oil and administered daily intraperitoneally (20 mg/kg/d). *ApoE*<sup>-/-</sup> mice were obtained from Charles Rivers (JAX mice stock 002052). To accelerate atherosclerosis, 3-month-old mice were fed a high-fat diet (10.8% total fat, 0.75% cholesterol; S4892-E010, Ssniff Spezialdiäten, Germany) during 6 weeks.

**Blood pressure measurements and *in vivo* imaging.** Arterial blood pressure (BP) was measured in mouse tails using the automated BP-2000 Blood Pressure Analysis System (Visitech Systems, Apex, NC, USA). In brief, mice were trained for BP measurements every day for 1 week. After the training period, BP was measured 1 d before treatment or before lentiviral infection to determine the baseline BP values in each mouse cohort. Measurements were repeated several times during experiments. BP measurements were recorded in mice that were restrained in a tail-cuff restrainer over a warmed surface (37 °C). Fifteen consecutive systolic and diastolic BP measurements were made, and the last ten readings per mouse were recorded and averaged.

For *in vivo* ultrasound images, the aortic diameter was monitored in isoflurane-anesthetized mice (2% isoflurane) by high-frequency ultrasound with a VEVO 2100 echography device (VisualSonics, Toronto, Canada) with 30- $\mu$ m resolution. Maximal internal diameters of aortic images were measured using VEVO 2100 software, version 1.5.0. All recordings were made by a cardiologist and a technician who were blinded to animal genotype and treatment. Measurements were taken before lentivirus administration or the corresponding treatments to determine the baseline diameters, and measurements were repeated several times during the experiment. In the indicated cases, after euthanization of the mice, the maximum external diameter of the AsAo was measured using a digital caliper (Ratio 6369H15).

The whole skeleton was imaged in anesthetized mice (1.5–2% isoflurane) using an X-Ray CT system integrated in a nano-PET-CT scanner (Mediso Medical Imaging Systems, Budapest). Images were acquired at 55 Kv, 500 mA/s, 360 frames per Rx rotation and pitch = 1. Skeletal three-dimensional reconstruction was performed with Medis software (Medis, the Netherlands).

**Cell procedures.** Primary mouse vascular smooth muscle cells (VSMCs) were isolated and grown as described<sup>20</sup>. All experiments were performed using cells

from passages 3–7. VSMCs were infected at a multiplicity of infection (MOI) = 3 over 5 h. The medium was then replaced with fresh Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% FBS, and cells were cultured for three more days, serum-starved for 48 h, and then stimulated with Ang-II for 6 h for protein assays or 4 h for mRNA expression analysis. HEK-293T and Jurkat cell lines were purchased from ATCC. All cells were *Mycoplasma* negative.

**siRNA-encoding lentivirus production and infection.** Lentiviruses expressing GFP and an siRNA targeting mouse *Adamts1* mRNA were purchased from ABM-GOOD. siRNA sequences were as follows: #siRNA27 (GGAAAGAATCC GCAGCTTTAGTCCACTCA); #siRNA57 (ACCGCCAGTGTGAGTTTACAT TCGGAGAG); #siRNA69 (CTTCCGAATGTGCAAGGAAGTGAAGCCA). siCt (GGTGAAGTCACTGTCAGAA) was used as a control. Pseudotyped lentiviruses were produced by transient calcium phosphate transfection of HEK-293T cells. Supernatant containing the lentiviral particles was collected 48 h after removal of the calcium phosphate precipitate and ultracentrifuged for 2 h at 26,000 r.p.m. (Ultraclar Tubes, SW28 rotor and Optima L-100 XP Ultracentrifuge; Beckman). Viruses were suspended in cold, sterile PBS solution and titrated by transduction of Jurkat cells for 48 h. Transduction efficiency (number of GFP-expressing cells) and cell death (propidium iodide staining) were quantified by flow cytometry.

For *in vivo* transduction experiments, animals were anesthetized (with ketamine and xylazine), and a small incision was made to expose the right jugular vein<sup>20</sup>. Virus solution (100  $\mu$ l, 10<sup>9</sup> particles/ml in PBS) was inoculated directly into the right jugular vein 3 weeks before Ang-II minipump implantation or 1 d before monitoring of aortic dilation. Transduction efficiency was analyzed in aortic samples by immunohistochemistry for GFP and *Adamts1*.

**Histology.** After euthanization by CO<sub>2</sub> inhalation, mouse aortas, kidneys and lungs were perfused with saline. Aortas and kidneys were then isolated and fixed in 10% formalin overnight at 4 °C, whereas lungs were fixed by intratracheal instillation of 10% formalin. Paraffin cross-section (5  $\mu$ m) from fixed organs were stained with hematoxylin and eosin, Masson's trichrome (Masson), Alcian blue or Verhoeff elastic-van Gieson (EVG), or they were used for immunohistochemistry or immunofluorescence. Deparaffinized sections were rehydrated, boiled to retrieve antigens (10 mM citrate buffer, pH 6) and blocked for 45 min with 10% goat serum plus 2% BSA in PBS. Samples were incubated with the following antibodies for immunohistochemistry or immunofluorescence: rabbit anti-*Adamts1* (1/100, sc-25581, Santa Cruz), rabbit anti-GFP (1/100, A11122, Invitrogen), rabbit anti-pSmad2 (1/50, 3108, Cell Signaling for immunohistochemistry; 1/20, 566415, Calbiochem, for immunofluorescence), rabbit anti-Smad2-Smad3 (sc-8332 1/100 Santa Cruz), rabbit anti-TGF- $\beta$ 1 (1/100; Abcam ab92486), rabbit anti-Nos2 (1/100, sc-650, Santa Cruz, for mice; 482728, Millipore, for human), monoclonal anti-SMA (1/500, C6198, Sigma), rat anti-F4/80 (1/50, MF48015, Invitrogen) and rabbit anti-Mmp9 (1/100, ab38898, Abcam). Specificity was determined by substituting primary antibody with unrelated IgG (Santa Cruz). For immunohistochemistry, color was developed with DAB (Vector Laboratories), and sections were counterstained with hematoxylin and mounted in DPX (Fluka). Images were acquired using a Leica DM2500 microscope with 20 $\times$ , 40 $\times$  or 63 $\times$  HCX PL Fluotar objective lenses and Leica Application Suite V3.5.0 acquisition software. For immunofluorescence, secondary antibodies were Alexa-Fluor-546-conjugated goat anti-rabbit and Alexa-Fluor-647-conjugated goat anti-rabbit (BD Pharmingen). Sections were mounted with DAPI in Citifluor AF4 mounting medium (Aname). Images were acquired at 1024  $\times$  1024 pixels, 8 bits, using a Leica SP5 confocal microscope with 20 $\times$  or 40 $\times$  oil-immersion objectives.

Collagen fibers in aortic sections were stained with a Masson-Goldner's trichrome staining kit (Merck), and elastic fibers were stained with a modified Verhoeff Van Gieson elastin stain kit (Sigma-Aldrich). Images were acquired using a Leica DM2500 microscope with 20 $\times$ , 40 $\times$  or 63 $\times$  HCX PL Fluotar objective lenses and Leica Application Suite V3.5.0 acquisition software and processed for presentation with Photoshop and Illustrator (Adobe) according to the guidelines of this journal. Images were then analyzed with MetaMorph 6.1 software (Universal Imaging Corp., Downingtown, PA). Collagen levels were quantified by thresholding the green signal using the hue-saturation-intensity color model and determining the percentage of stained area in the entire medial layer of two

nonconsecutive aortic cross-sections per mouse, using 4–16 mice per experiment. The mean percentage was calculated. Elastic lamina breaks, defined as interruptions in the elastic fibers, were counted in the entire medial layer of six nonconsecutive cross-sections per mouse, using 4–16 mice per experiment, and the mean number of breaks was calculated. The exact number of mice per group is indicated in the figure legends.

**Immunoblot analysis.** Samples from mouse aortas were isolated, frozen in liquid nitrogen and then homogenized (MagNA lyzer, Roche). Protein extracts were obtained by lysis in ice-cold RIPA buffer (50 mM NaCl, 50 mM Tris HCl pH 8, 1% NP40, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycolate) that was completed with protease, phosphatase and kinase inhibitors. For VSMCs, cells were infected and then stimulated with Ang-II, washed with ice-cold PBS and lysed in RIPA buffer.

Proteins were separated under reducing conditions on SDS–polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose membranes. Proteins were detected with the following primary antibodies: rabbit anti-Adams1 (1/1,000; sc-25581 Santa Cruz), anti-Nos2 (1/1,000, sc-650 Santa Cruz), anti-p-AKT(Ser473) (1/1,000, #9271 Cell Signaling), anti-Akt (1/1,000, #9272 Cell Signaling), anti-p-p65 (1/500, #3033 Cell Signaling) and anti-p65 (1/1,000, #8242 Cell Signaling); mouse monoclonal anti- $\alpha$ -tubulin (1/40,000; T 6074 Sigma-Aldrich) and anti-Gapdh (1/10,000; ab8245 Abcam). Bound antibodies were detected with enhanced-chemiluminescence (ECL) detection reagent (Millipore). Uncropped immunoblots are shown in **Supplementary Figure 9**.

**Real-time and quantitative PCR.** Aortas were extracted after perfusion with 5 ml saline solution, and the adventitia layer was discarded. Frozen tissue was homogenized using a mortar and an automatic bead homogenizer (MagNA Lyzer, Roche). Total RNA was isolated with TRIzol (Life Technologies). Total RNA (2  $\mu$ g) was reverse-transcribed at 37 °C for 50 min in a 20- $\mu$ l reaction mix containing 200 U Moloney murine leukemia virus (MMLV) reverse transcriptase (Life Technologies), 100 ng random primers and 40 U RNase Inhibitor (Life Technologies). Real-time quantitative RT–PCR was performed with the following PCR primers: *Adams1* (ACACTGGCGGTGGCATCGT, GCCAGCCCTGGTCACCTTGC), *Tgfb1* (CGCCATCTATGAGAAAACC, GTAACGCCAGGAATTGT), *Ctgf* (GTGCC AGAACGCACACTG, CCCCGTTACACTCCAAA), *Coll1a1* (GTCCTCTTA GGGGCCACT, CCACGCTCACCATTGGGG), *Pa1* (GCCAGATTT ATCAT CAATGACTGGG, GGAGAGGTGCACATCTTCTC AAAG), *Nos3* (GTTTGT CTGCGGCGATGTC, CATGCCGCCCTCTGTTG) and *Nos2* (CAGCTGGG CTGTACAAACCTT, CATTGGAAGTGAAGCGTTTCG). qPCR reactions were performed in triplicate with SYBR master mix (Applied Biosystems), according to the manufacturer's guidelines. To examine probe specificity, we conducted a post-amplification melting-curve analysis. For each reaction, only one melting-temperature ( $T_m$ ) peak was produced. The amount of target mRNA in samples was estimated by the  $2^{-CT}$  relative quantification method, using *Gapdh* for normalization. Fold ratios were calculated relative to mRNA expression levels from control animals.

**Nitric oxide staining, and nitrite and nitrate quantification.** NO was stained in unfixed fresh aortic sections with 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein (DAF-FM) diacetate and in VSMCs with diaminehodamine (DAR)-4M (Molecular Probes). Samples were incubated with 10  $\mu$ mol/liter

DAF-FM diacetate reagent for 1 h at room temperature and mounted in 10% glycerol in PBS. Images were acquired with a Leica SP5 microscope. Nitrites and nitrates (total NOx) were measured in conditioned medium from transduced VSMCs after 24 h using a nitric oxide quantification kit (Active Motif).

**Zymography.** Aortic extracts were prepared from whole aortas as described for immunoblot assays, but in the absence of DTT. Extracts (15  $\mu$ g) were fractionated under nonreducing conditions on SDS–polyacrylamide gels containing 1% gelatin. Gels were washed three times in 2.5% Triton X-100 for 30 min at room temperature, incubated overnight at 37 °C in 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM CaCl<sub>2</sub> and 200 mM NaCl, and stained with Coomassie Blue. The areas of gelatinolytic or MMP activity were visualized as transparent bands. Images were analyzed with Quantity One software (Bio-Rad).

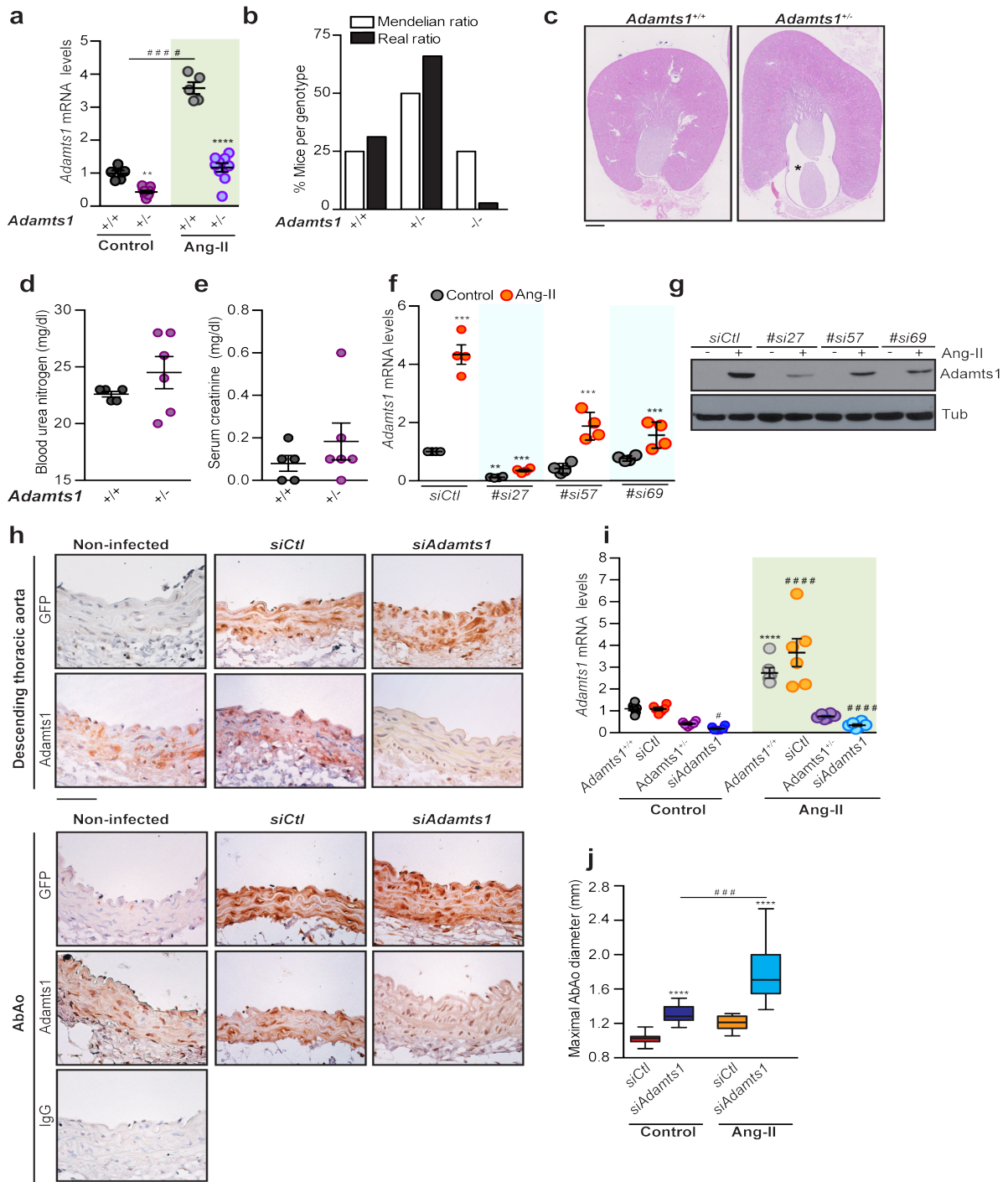
**Human samples.** The study was approved by the Ethics and Clinical Research Committee of Cantabria (ref. 27/2013) and by the Ethics Committee of Ghent University Hospital (B6502011160). Ascending aortas for use as controls were obtained anonymously from multiorgan transplant donors after written informed consent was obtained from their families. During preparation of the heart for transplantation, excess ascending aortic tissue was harvested for the study. Samples from patients with Marfan syndrome were obtained during elective or emergency aortic root surgery for aortic root aneurysm–dissection. Patient clinical data were retrieved while maintaining anonymity. Tissues were immediately fixed, kept at room temperature for 48 h and embedded in paraffin.

**Statistical analysis.** GraphPad Prism software 6.01 was used for the analysis. The aortic-diameter data are presented as box and whiskers plots, with 75th and 25th percentiles; bars represent maximal and minimal values. Differences were analyzed by one-way, two-way or repeated-measurements two-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's *post hoc* test or Newman's *post hoc* test (experiments with  $\geq 3$  groups), as appropriate. For survival curves, differences were analyzed with the log-rank (Mantel–Cox) test. Statistical significance was assigned at \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  and \*\*\*\* $P < 0.0001$ .

Sample size was chosen empirically based on our previous experiences in the calculation of experimental variability; no statistical method was used to predetermine sample size, and no data were excluded. The numbers of animals used are described in the corresponding figure legends. All experiments were done with at least three biological replicates. Experimental groups were balanced in terms of animal age, sex and weight. Animals were genotyped before experiments, and they were all caged together and treated in the same way. Appropriate tests were chosen according to the data distribution. Variance was comparable between groups in experiments described throughout the manuscript. Investigators were blinded to group allocation in the experiments included in **Supplementary Figure 8b**. For the rest of experiments, no randomization was used to allocate animals to experimental groups, and investigators were not blinded to group allocation during experiments or to outcome assessments.

58. Judge, D.P. *et al.* Evidence for a critical contribution of haploinsufficiency in the complex pathogenesis of Marfan syndrome. *J. Clin. Invest.* **114**, 172–181 (2004).
59. Laubach, V.E., Shesely, E.G., Smithies, O. & Sherman, P.A. Mice lacking inducible nitric oxide synthase are not resistant to lipopolysaccharide-induced death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 10688–10692 (1995).

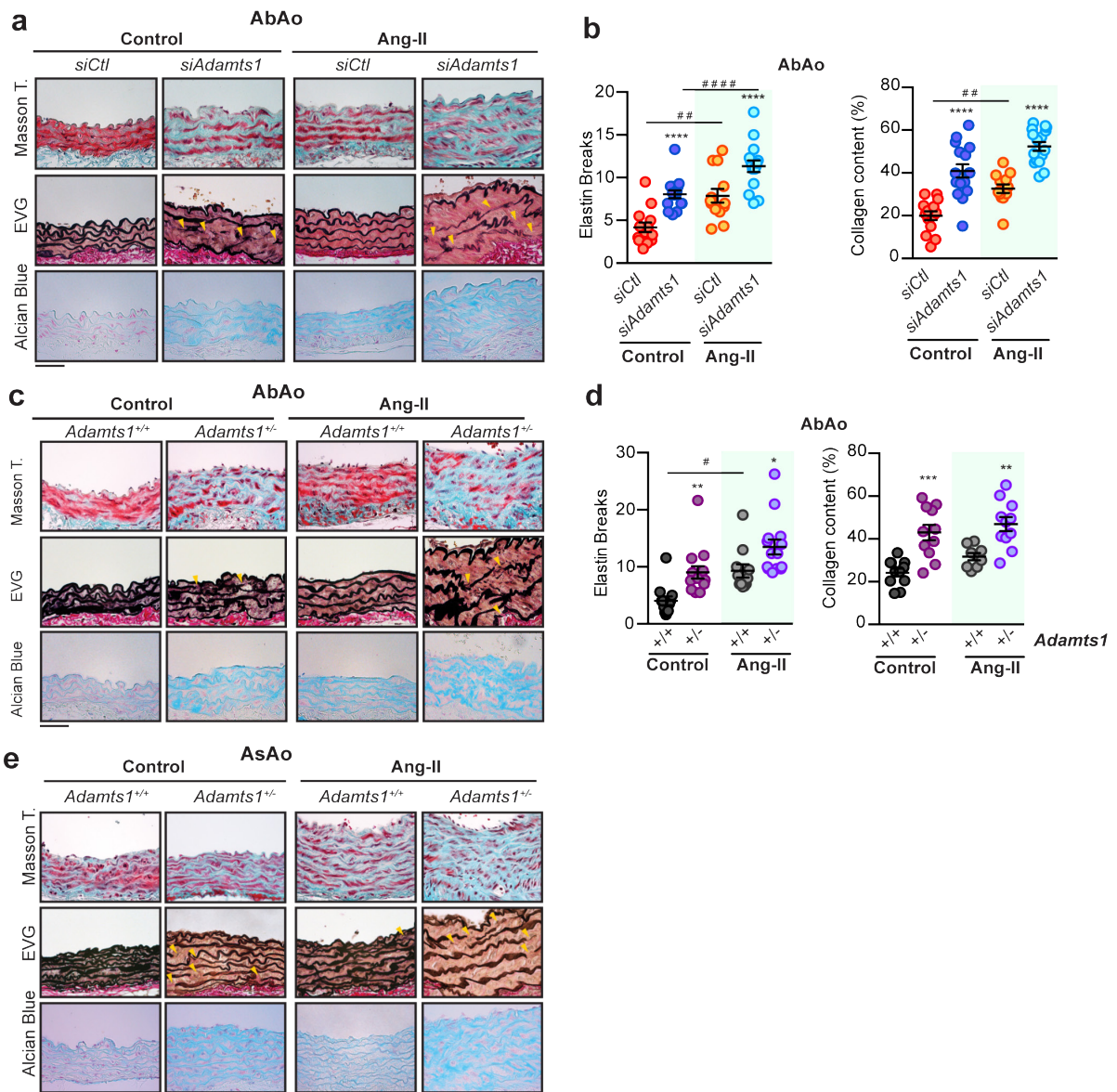




Supplementary Figure 1

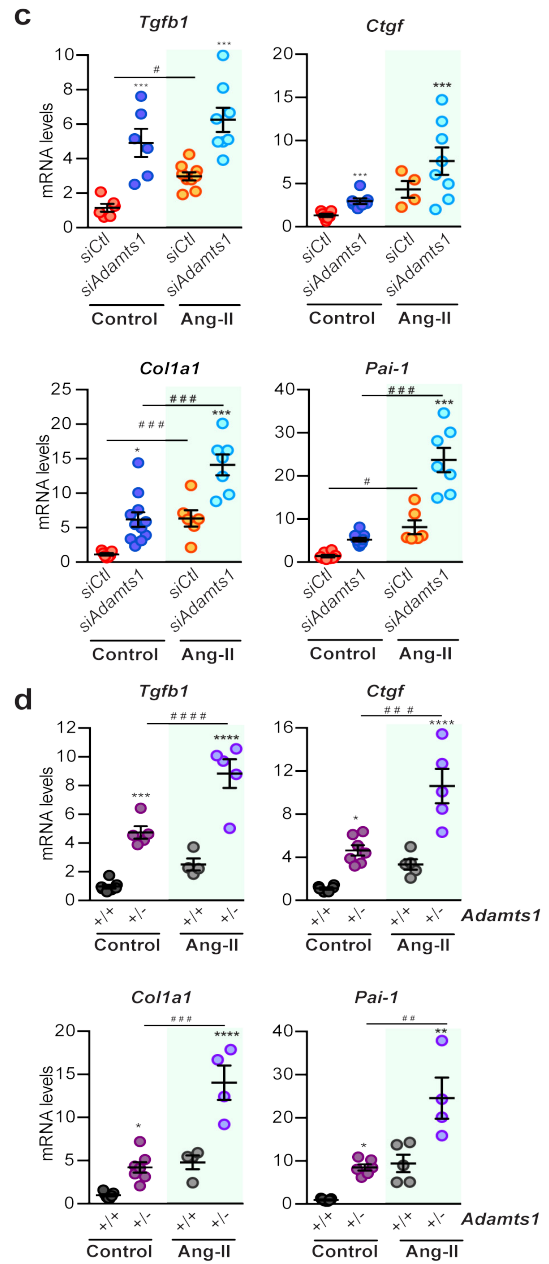
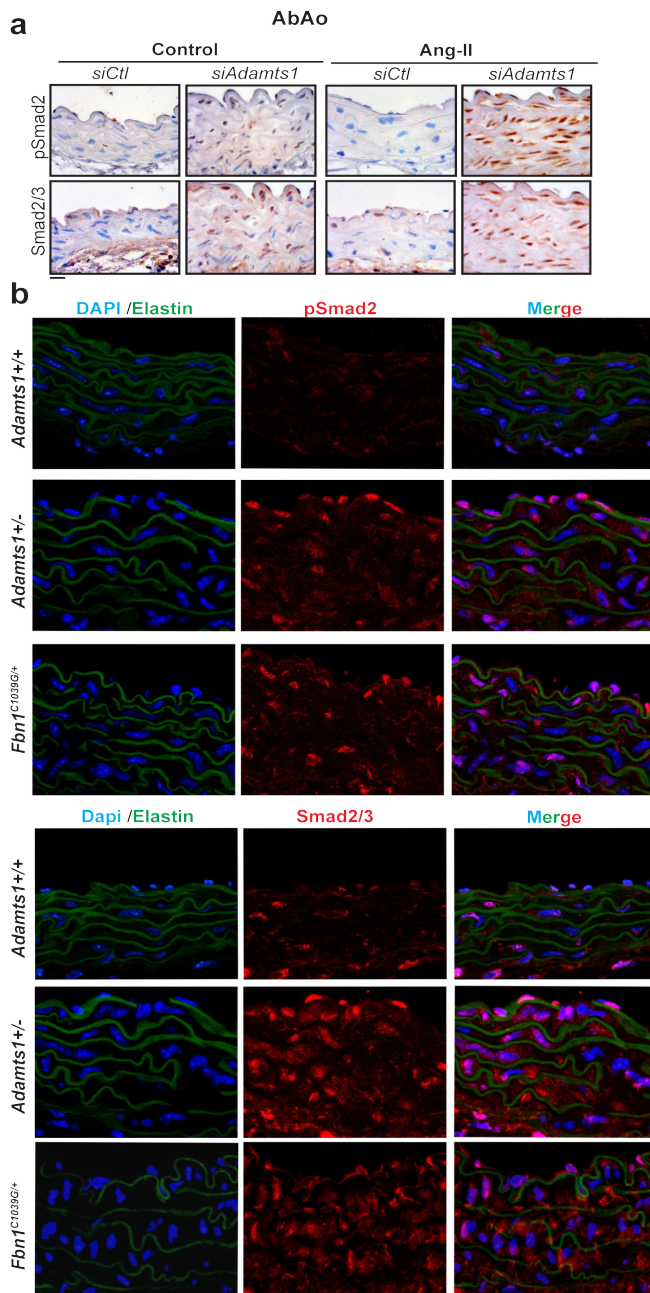
**Supplementary Figure 1. *Adamts1* haploinsufficiency and knockdown in the mouse.**

**(a)** RT-qPCR analysis of *Adamts1* mRNA expression in 5 *Adamts1*<sup>+/+</sup> and 9 *Adamts1*<sup>+/-</sup> treated for 28 days as indicated. One-way ANOVA, \*p<0.05, \*\*\*p<0.001 *Adamts1*<sup>+/+</sup> vs *Adamts1*<sup>+/-</sup>. ####p<0.001 Control *Adamts1*<sup>+/+</sup> vs Ang-II *Adamts1*<sup>+/+</sup>. **(b)** Percentage of *Adamts1*<sup>+/+</sup>, *Adamts1*<sup>+/-</sup>, and *Adamts1*<sup>-/-</sup> mice alive at weaning vs their expected Mendelian ratio (n=151). **(c)** Representative hematoxylin-eosin (H&E) staining of transverse kidney sections from 3-4-month-old 10 *Adamts1*<sup>+/+</sup> and 7 *Adamts1*<sup>+/-</sup> mice; \*indicates hydronephrotic space. Scale bar, 500 µm. **(d)** Plasma urea and **(e)** plasma creatinine levels in 9-week-old *Adamts1*<sup>+/+</sup> (n=5) and *Adamts1*<sup>+/-</sup> (n=6) mice (mean ± SEM). **(f-g)** Vascular smooth muscle cells were transduced with lentivirus encoding *Adamts1*-specific siRNA (#si27, #si57, #si69) or a control siRNA (*siCtl*). *Adamts1* levels were analyzed by **(f)** RT-qPCR and **(g)** immunoblot in extracts from these cells. mRNA amounts were normalized to *Gapdh* expression (mean±SEM; n=4 per group). Two-way ANOVA, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001 vs untreated *siCtl*. Tubulin expression was used as a loading control. **(h)** Representative GFP and *Adamts1* immunostaining on AbAo sections (n = 4 mice per group). IgG staining serves as a negative control. Scale bar, 50 µm. **(i)** *Adamts1* mRNA levels in aortic samples from the indicated mice and treatments (n = 6 mice per group). mRNA amounts were normalized to *Gapdh* expression (mean±SEM). Two-way ANOVA, \*\*\*\*p<0.0001 vs control *Adamts1*<sup>+/+</sup>; #p<0.05, #####p<0.0001 vs control *siCtl*. **(j)** End-of-experiment maximal aortic diameter (mean±SEM) analyzed in the same cohort of mice as Fig. 2d. One-way ANOVA, \*\*\*\*p<0.001 *siCtl* vs *siAdamts1*; ###p<0.001 control vs Ang-II.



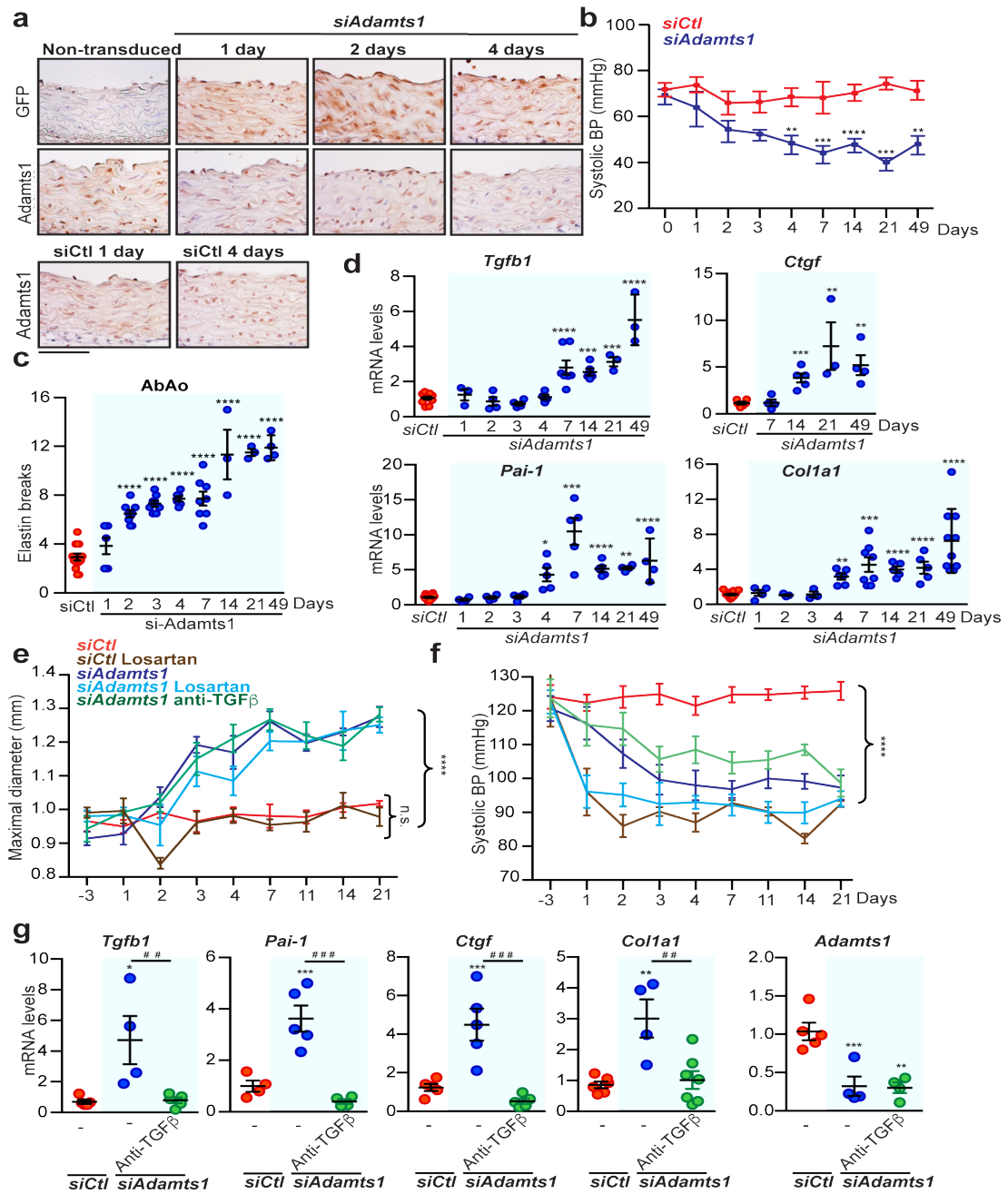
Supplementary Figure 2

**Supplementary Figure 2. *Adamts1* deficiency induces aortic medial degeneration. (a)** Representative Masson's trichrome (Masson T), elastin van Gieson (EVG), and alcian blue staining and **(b)** quantification of elastin breaks and collagen content in AbAo sections from the mouse cohorts shown in Figure 2g. **(c-e)** Representative Masson's trichrome (Masson T), elastin van Gieson (EVG), and alcian blue staining on (c) AbAo and (e) AsAo sections and (d) quantification of elastin breaks and collagen content in AbAo sections from the mouse cohorts shown in Figure 2h. (a,c,e) Scale bars, 50  $\mu$ m. (b,d)) Two-way ANOVA, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  *siCtl* vs *siAdamts1* or *Adamts1<sup>+/+</sup>* vs *Adamts1<sup>+/-</sup>*; # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ , ### $p < 0.001$ , #### $p < 0.0001$  Control vs Ang-II.



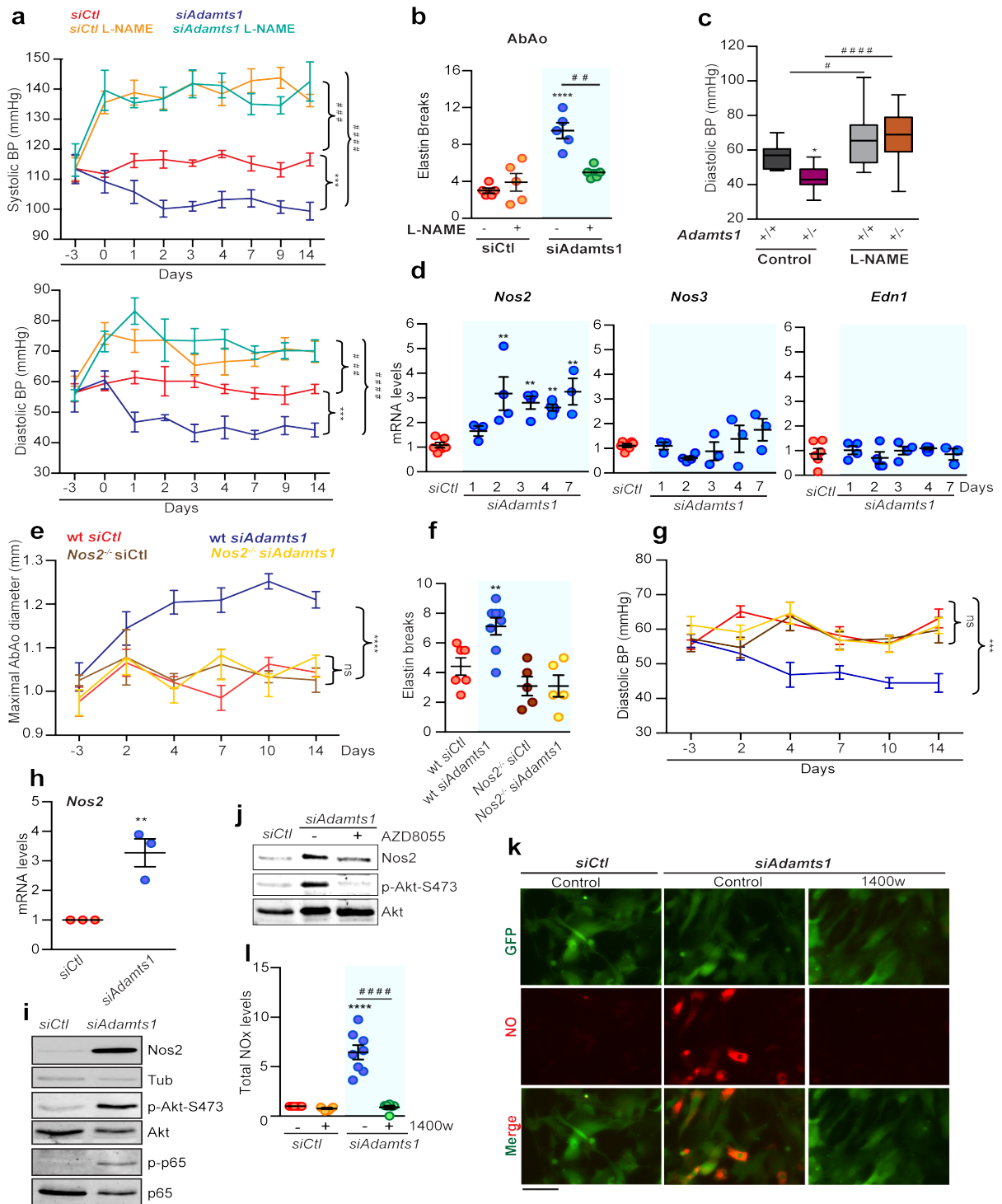
Supplementary Figure 3

**Supplementary Figure 3. Activation of the TGF $\beta$  pathway in the aorta of Adamts1 deficient mice.** (a) Representative pSmad2 and Smad2/3 immunostaining (n = 3 mice per group) on AbAo cross sections from *siCtl-* and *siAdamts1*-transduced mice treated as indicated. Scale bar, 50  $\mu$ m. (b) Representative images of pSmad2 or Smad2 immunofluorescence (red), elastin autofluorescence (green), and DAPI-stained nuclei (blue) in aortic sections from *Adamts1*<sup>+/+</sup>, *Adamts1*<sup>+/-</sup> and *Fbn1*<sup>+/-C1039G</sup> mice (n = 3 mice per group). Bar, 50  $\mu$ m. RT-qPCR analysis of *Tgfb1*, *Ctgf*, *Col1a1*, and *Pai-1* mRNA expression in extracts from control and Ang-II-treated (c) *siCtl-* and *siAdamts1*-transduced mice and (d) *Adamts1*<sup>+/+</sup> and *Adamts1*<sup>+/-</sup> mice. Two-way ANOVA, \*p<0.05, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001, *siCtl* vs *siAdamts1*; #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001, ####p<0.0001, Control vs Ang-II.



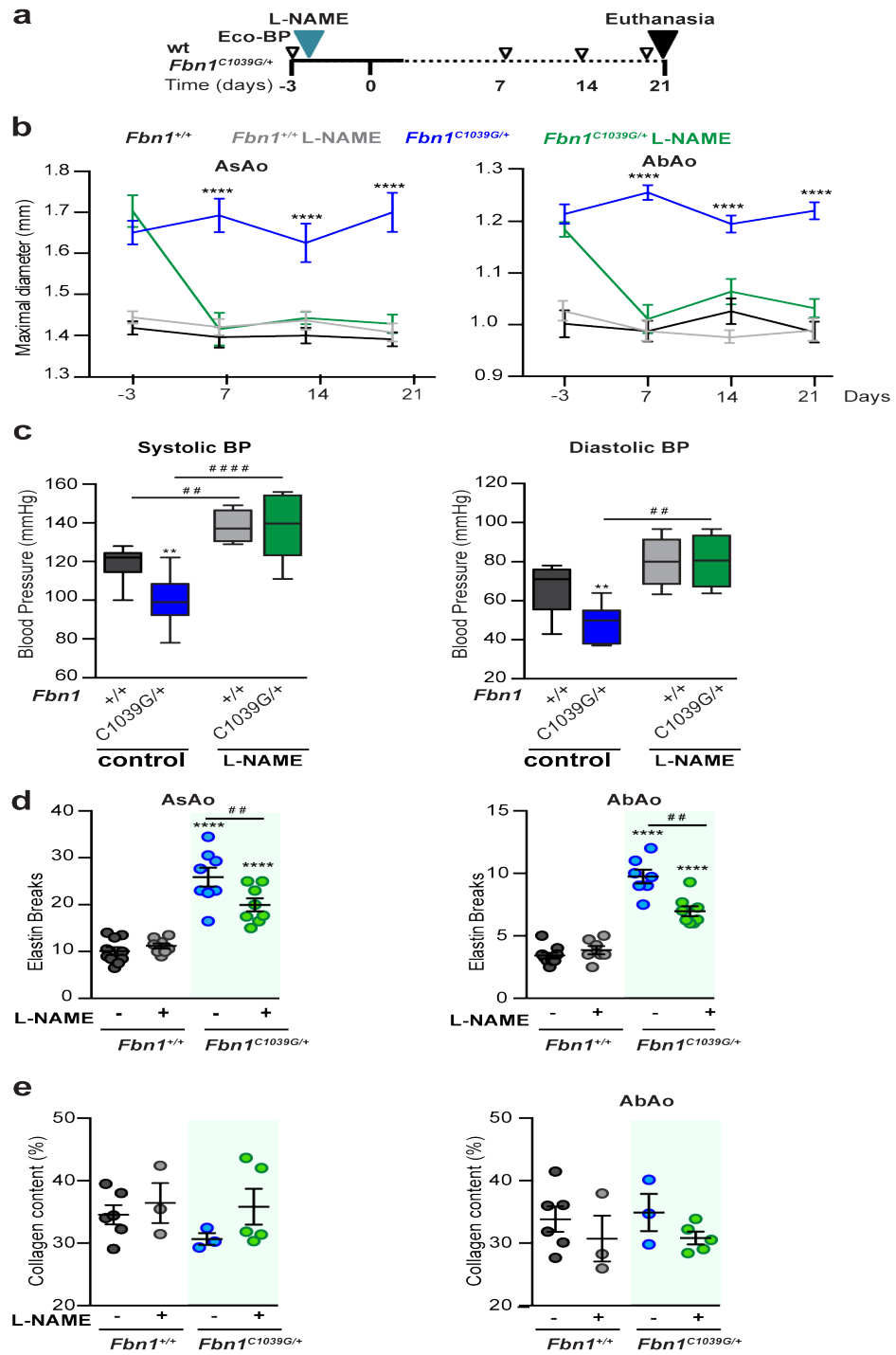
Supplementary Figure 4

**Supplementary Figure 4. Aortic disease induced by *Adamts1* deficiency is fast and independent of TGF $\beta$ .** (a) Representative immunostaining of GFP and *Adamts1* from animals in the same cohort of mice as Figures 3b-f. Scale bar 50  $\mu$ m. (b) Diastolic BP (mean  $\pm$  SEM) measured at the indicated times in *siCtl*- and *siAdamts1*-transduced mice. Repeated-measurements two-way ANOVA; \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001 vs *siCtl* at each time point. (c) Elastin breaks in AbAo cross sections from the same mice. (d) RT-qPCR analysis of *Tgfb1*, *Ctgf*, *Col1a1* and *Pai-1* expression in the same mice at the indicated times. mRNA amounts were normalized to *Gapdh* expression. One-way ANOVA; \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001 vs *siCtl*. (b,c,d) Same cohort of mice as Figures 3c, 3d, and 3b, respectively. *siCtl* results in (c,d) were stable throughout the experimental period, and data are means of readings at 2, 4, 7, 14, 21, and 49 days. (e) Maximal AbAo diameter (mean  $\pm$  SEM) and (f) systolic BP (mean  $\pm$  SEM) at the indicated times in 8 *siCtl*, 4 *siCtl* losartan, 5 *siAdamts1*, 7 *siAdamts1* losartan, and 6 *siAdamts1* anti-TGF $\beta$  mice. Repeated measurements two-way ANOVA of group means, \*\*\*\*p<0.0001 vs *siCtl*; n.s., non-significant. (g) RT-qPCR analysis of *Tgfb1*, *Pai-1*, *Ctgf*, *Col1a1* and *Adamts1* mRNA. mRNA amounts were normalized to *Gapdh* expression. One-way ANOVA; \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 vs *siCtl*; ##p<0.05, ###p<0.001.



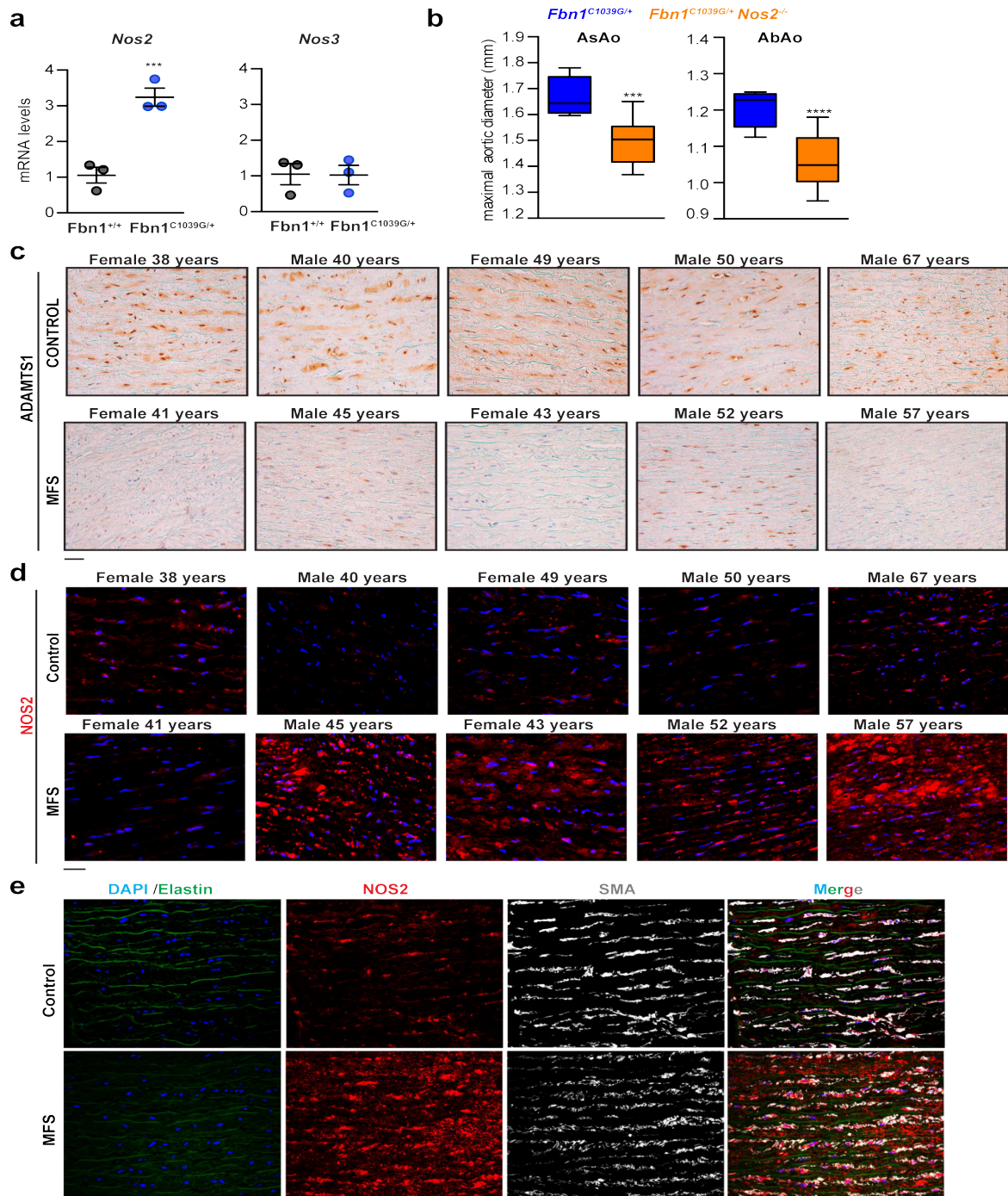
Supplementary Figure 5

**Supplementary Figure 5. The Akt-Nos2 pathway mediate the aortic disease triggered by Adamts1 deficiency.** (a) Systolic and diastolic BP at the indicated times in *siCtl*- and *siAdamts1*-transduced mice treated with L-NAME as indicated (mean±SEM; n=5 for each group). Repeated measurements two-way ANOVA of group means, \*\*\*p<0.001; ###p<0.001, ####p<0.0001 control vs L-NAME. End-of-experiment (b) quantification of elastin breaks in AbAo sections and (c) diastolic BP in the same cohort of mice shown in Fig. 4g-4h. (b,c) Two-way ANOVA, \*p<0.05, \*\*\*\*p<0.0001 vs untreated *siCtl* or *Adamts1<sup>+/+</sup>* vs *Adamts1<sup>-/-</sup>*; #p<0.05, ##p<0.01, ####p<0.0001, L-NAME vs untreated. (d) RT-qPCR analysis of *Nos2*, *Nos3* and *Edn1* mRNA expression at the indicated times in aortic extracts from *siCtl*- and *siAdamts1*-transduced mice. *siCtl*: n = 6; *siAdamts1*: the number of mice is shown in the figure. mRNA amounts were normalized to *Gapdh* expression. One-way ANOVA, \*\*p<0.01 vs *siCtl*. (e) Maximal AbAo diameter (mean±SEM) at the indicated time points (same mouse cohort as Fig. 5c). (f) End-of-experiment quantification of elastin breaks (mean ± SEM) in the AbAo of 6 *siCtl*-treated WT mice, 8 *siAdamts1*-treated WT mice, 5 *siCtl*-treated *Nos2<sup>-/-</sup>* mice, and 5 *siAdamts1*-treated *Nos2<sup>-/-</sup>* mice. (g) Diastolic BP (mean ± SEM) (mouse cohort in Fig. 5f). (e,g) Repeated measurement two-way ANOVA of group means, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001 vs *Nos2<sup>-/-</sup> siAdamts1*; ns, non-significant. (f) Two-way ANOVA, \*\*p<0.01 vs wt *siCtl*. (h) RT-qPCR analysis of *Nos2* mRNA in extracts from VSMCs transduced with *siCtl* or *siAdamts1* (mean ± SEM, n = 3 mice per group). Student's t-test, \*\*p<0.01. (i) Representative immunoblot analysis of *Nos2* (n = 4 per group), p-Akt-S473 (n=3 per group), Akt (n=3 per group), p-p65-S536 (n=3 per group), and p65 (n=3 per group) in extracts from VSMCs transduced with *siCtl* or *siAdamts1*. Tubulin (n=4 per group) was used as loading control. (j) Representative immunoblot analysis (n=3 per group) of *Nos2*, pAkt-S473, and Akt in extracts from VSMCs transduced with *siCtl* or *siAdamts1* and treated with the mTOR inhibitor AZD8055 as indicated. (k) Nitrites and Nitrates (total NOx) quantitation in conditioned media from VSMCs transduced with *siCtl* or *siAdamts1* and treated with the *Nos2* inhibitor 1400w as indicated. 8 untreated and 6 treated *siCtl* mice, and 8 untreated and 6 treated *siAdamts1* mice. (l) Representative images (n=3 per group) of NO production (red), and GFP fluorescence (green) in unfixed VSMCs transduced with *siCtl* or *siAdamts1* and treated with the *Nos2* inhibitor 1400w as indicated. Bar, 50 µm.



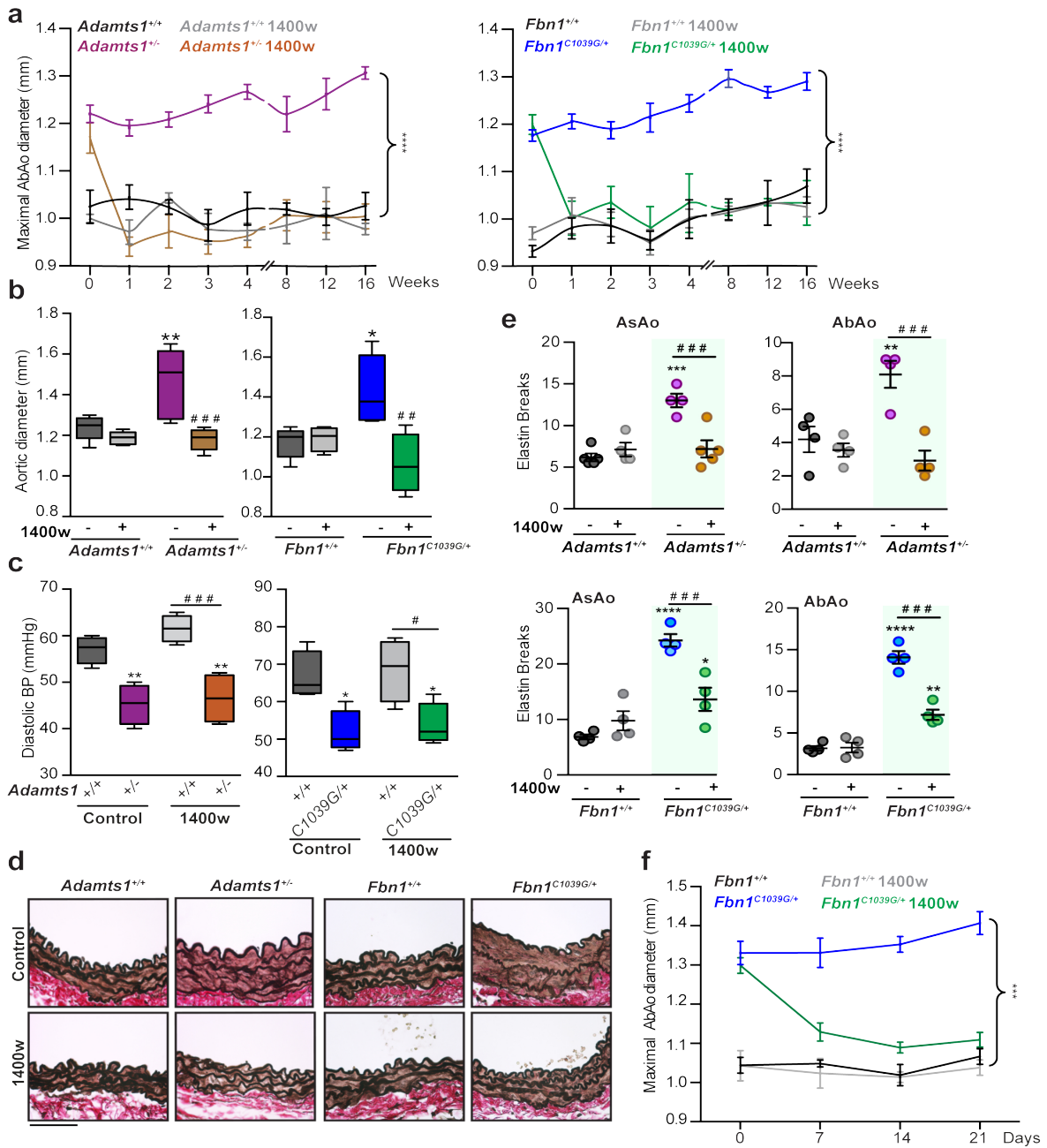
Supplementary Figure 6

**Supplementary Figure 6. The L-NAME NOS inhibitor reverses aortic dilation in MFS mice despite its hypertensive effects. (a)** Experimental scheme. Twelve-week-old male and female wt and *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> mice were given L-NAME in the drinking water for 21 days. Aortic dilation and BP were determined at the indicated times and before euthanasia. **(b)** Maximal AsAo and AbAo diameter (mean±SEM) at the indicated times in 9 *Fbn1*<sup>+/+</sup>, 7 *Fbn1*<sup>+/+</sup> L-NAME, 8 *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>, and 8 *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> L-NAME mice. Repeated measurements two-way ANOVA, \*\*\*\*<0.0001 vs *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> L-NAME at the same time point. End-of-experiment quantification of **(c)** systolic and diastolic BP, **(d)** elastin breaks in the AsAo and AbAo, and **(e)** collagen content in the same mice. (c and d) Same cohort of mice as in (b). (e) 6 *Fbn1*<sup>+/+</sup>, 3 *Fbn1*<sup>+/+</sup> L-NAME, 3 *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>, and 5 *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> L-NAME mice. (c-e) Two-way ANOVA, \*\*p<0.01, \*\*\*\*p<0.0001 vs untreated *Fbn1*<sup>+/+</sup>; ##p<0.01, ####p<0.0001 control vs L-NAME.



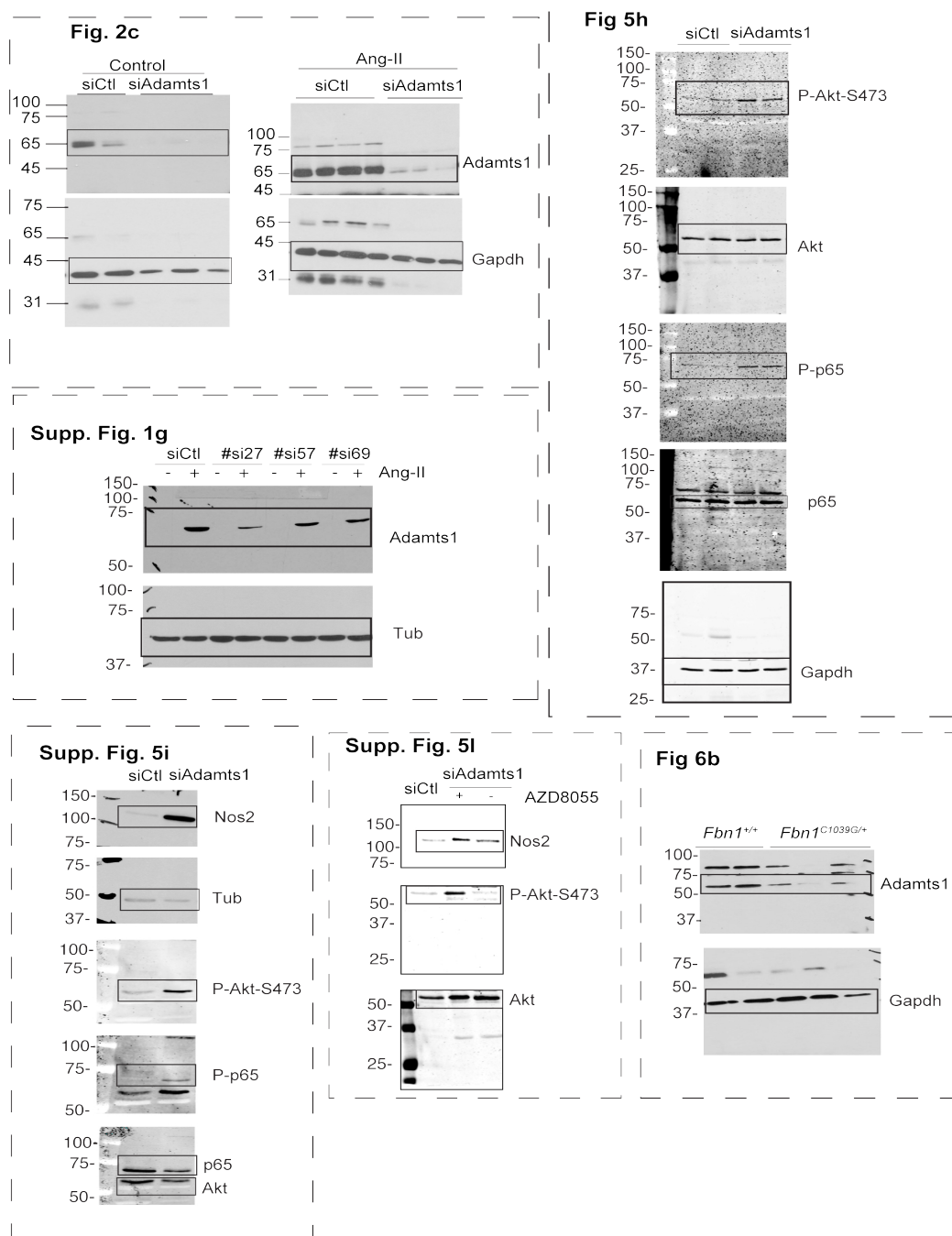
Supplementary Figure 7

**Supplementary Figure 7. The ADAMTS1-NOS2 axis is deregulated in aortic samples of human MFS.** (a) RT-qPCR analysis of *Nos2* and *Nos3* mRNA in aortic extracts from 3 wt and 3 *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> mice. Student's t-test, \*\*\*p<0.001. (b) Maximal AsAo and AbAo diameter (mean±SEM) of 8 *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> and 14 *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>;*Nos2*<sup>-/-</sup> at 12 weeks of age. Student's t-test, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001. (c) Representative medial layer images of ADAMTS1 immunohistochemistry in aortic cross sections of human samples from 5 healthy donors and 9 MFS patients. Bar, 25 µm. (d) Medial layer images of NOS2 (red) immunofluorescence and DAPI-stained nuclei (blue) in sections from 5 control donors and 5 MFS patients. (e) Representative medial layer images of NOS2 (red) and SMA (white) immunofluorescence, elastin autofluorescence (green), and DAPI-stained nuclei (blue) in sections from 5 control donors and 8 MFS patients. Bar, 25 µm.



Supplementary Figure 8

**Supplementary Figure 8. NOS2-specific inhibition reverses aortic pathology in *Adamts1* deficient mice and in MFS model mice.** (a) Maximal AbAo diameter (mean±SEM) at the indicated times in the same cohort of mice shown in Fig 6g. Repeated-measurements two-way ANOVA of group means, \*\*\*\*p<0.0001 vs *Adamts1*<sup>+/-</sup> 1400W or *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> 1400W. (b) End-of-experiment maximal AsAo diameter (mean±SEM) measured *ex vivo* with a digital caliper in the same animals. Two-way ANOVA, \*p<0.05, \*\*p<0.01 vs untreated wt; #p<0.01, ###p<0.001 vs untreated *Adamts1*<sup>+/-</sup> or *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>. (c) End-of-experiment quantification of diastolic BP in the same mice. Two-way ANOVA, \*p<0.05, \*\*p<0.01 vs untreated wt; #p<0.05 ###p<0.001. (d) Representative images from EVG staining and (e) quantification of elastin breaks (mean±SEM) in the same cohort of animals. Scale bar, 50µm. Two-way ANOVA, \*p<0.05 \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001 vs untreated wt; ###p<0.001. (f) Maximal AbAo diameter (mean±SEM) at the indicated times in the same cohort of mice shown in Fig 6j. Repeated-measurements two-way ANOVA of group means, \*\*\*p<0.001 vs *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> 1400W.



**Supplementary Figure 9.**

Uncropped images of representative western blot images from Figures in the manuscript.



Anexo III







## C/EBP $\beta$ and Nuclear Factor of Activated T Cells Differentially Regulate Adamts-1 Induction by Stimuli Associated with Vascular Remodeling

Jorge Oller,<sup>a</sup> Arántzazu Alfranca,<sup>a,b</sup> Nerea Méndez-Barbero,<sup>a</sup> Silvia Villahoz,<sup>a</sup> Noelia Lozano-Vidal,<sup>a</sup> Mara Martín-Alonso,<sup>a</sup> Alicia G. Arroyo,<sup>a</sup> Amelia Escolano,<sup>a</sup> Angel Luis Armesilla,<sup>c</sup> Miguel R. Campanero,<sup>d</sup> Juan Miguel Redondo<sup>a</sup>

Department of Vascular Biology and Inflammation, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III, Madrid, Spain<sup>a</sup>; Unidad de Biotecnología Celular, Instituto de Investigación en Enfermedades Raras, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain<sup>b</sup>; Research Institute in Healthcare Science, School of Pharmacy, Faculty of Science and Engineering, University of Wolverhampton, Wolverhampton, United Kingdom<sup>c</sup>; Department of Cancer Biology, Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, CSIC-UAM, Madrid, Spain<sup>d</sup>

**Emerging evidence indicates that the metalloproteinase Adamts-1 plays a significant role in the pathophysiology of vessel remodeling, but little is known about the signaling pathways that control Adamts-1 expression. We show that vascular endothelial growth factor (VEGF), angiotensin-II, interleukin-1 $\beta$ , and tumor necrosis factor  $\alpha$ , stimuli implicated in pathological vascular remodeling, increase Adamts-1 expression in endothelial and vascular smooth muscle cells. Analysis of the intracellular signaling pathways implicated in this process revealed that VEGF and angiotensin-II upregulate Adamts-1 expression via activation of differential signaling pathways that ultimately promote functional binding of the NFAT or C/EBP $\beta$  transcription factors, respectively, to the *Adamts-1* promoter. Infusion of mice with angiotensin-II triggered phosphorylation and nuclear translocation of C/EBP $\beta$  proteins in aortic cells concomitantly with an increase in the expression of Adamts-1, further underscoring the importance of C/EBP $\beta$  signaling in angiotensin-II-induced upregulation of Adamts-1. Similarly, VEGF promoted NFAT activation and subsequent Adamts-1 induction in aortic wall in a calcineurin-dependent manner. Our results demonstrate that Adamts-1 upregulation by inducers of pathological vascular remodeling is mediated by specific signal transduction pathways involving NFAT or C/EBP $\beta$  transcription factors. Targeting of these pathways may prove useful in the treatment of vascular disease.**

**H**emodynamic mechanical forces, endocrine or paracrine cellular factors such as vascular endothelial growth factor (VEGF) or angiotensin-II (Ang-II), and the proinflammatory cytokines interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) are strongly implicated in vascular remodeling, including vascular smooth muscle cell (VSMC) proliferation and migration, neovascularization, endothelial cell (EC) dysfunction, and/or inflammatory cell infiltration (1–4). Furthermore, profound changes in the extracellular matrix of the aortic wall, mediated by cellular secretion of extracellular matrix components and protein metalloproteinases, represent a critical hallmark of this process (5, 6).

Emerging evidence suggests that increased expression of the metalloproteinase Adamts-1 is associated with remodeling of the extracellular matrix in the aortic wall (7–10). Adamts-1 is a member of the ADAMTS (A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs type I) family of proteases, which degrades the proteoglycans nidogen, aggrecan, syndecan, versican, and brevican (11). The expression of *Adamts-1* mRNA has been reported to increase in proliferating/migrating VSMCs (7) and in ECs treated with VEGF (12) and high wall shear stress (13, 14). However, the intracellular signaling pathways involved in its upregulation by these stimuli are poorly understood.

Here, we report that the expression of Adamts-1 in endothelial and vascular smooth muscle cells is induced by a broad range of stimuli associated with vascular remodeling, including VEGF, Ang-II, IL-1 $\beta$ , and TNF- $\alpha$ . We provide evidence supporting the alternative involvement of either NFAT or C/EBP $\beta$  in *Adamts-1* transcriptional activation by these stimuli and show *in vivo* activation of these transcription factors by VEGF and Ang-II, respec-

tively, which might be involved in Adamts-1 induction in the aorta.

### MATERIALS AND METHODS

**Cell culture and reagents.** Human umbilical vein ECs (HUVECs) were isolated from umbilical veins (15). Cells were cultured in 0.5% gelatin-coated plates in medium 199 supplemented with 20% fetal calf serum (FCS), 50  $\mu$ g/ml bovine brain extract, 100  $\mu$ g/ml heparin, and 1% penicillin-streptomycin. Cells were used between passages 4 and 6. Murine VSMCs were isolated and grown as described previously (16). Murine lung ECs (MLECs) were purified and cultured by previously published methods (17).

Cells were stimulated with 50 ng/ml recombinant human VEGF<sub>165</sub>, 100 ng/ml IL-1 $\beta$ , or 50 ng/ml TNF- $\alpha$  (all from Peprotech). Ang-II ( $10^{-6}$  M for MLECs or VSMCs or  $10^{-5}$  M for HUVECs) and phorbol myristate

Received 14 May 2015 Returned for modification 8 June 2015

Accepted 22 July 2015

Accepted manuscript posted online 27 July 2015

Citation Oller J, Alfranca A, Méndez-Barbero N, Villahoz S, Lozano-Vidal N, Martín-Alonso M, Arroyo AG, Escolano A, Armesilla AL, Campanero MR, Redondo JM. 2015. C/EBP $\beta$  and nuclear factor of activated T cells differentially regulate Adamts-1 induction by stimuli associated with vascular remodeling. *Mol Cell Biol* 35:3409–3422. doi:10.1128/MCB.00494-15.

Address correspondence to Miguel R. Campanero, mcampanero@iib.uam.es, or Juan Miguel Redondo, jmredondo@cnic.es.

J.O. and A.A. contributed equally to this work.

M.R.C. and J.M.R. contributed equally as senior authors.

Copyright © 2015, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/MCB.00494-15

acetate (10 ng/ml) were purchased from Sigma-Aldrich. Calcium ionophore A23187 (1  $\mu$ M) was obtained from EMD, Tocris Bioscience. Where indicated, cells were treated with 200 ng/ml cyclosporine (CsA) for 30 min prior to stimulation.

**Western blot analysis.** Cell extracts were obtained as described previously (16). Proteins were separated on SDS-polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose membranes. Membranes were incubated with the corresponding primary antibody. Primary antibodies were detected by incubation with either a 1:5,000 dilution of peroxidase-conjugated goat anti-mouse immunoglobulin antibody (Sigma) or a 1:5,000 dilution of peroxidase-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin antibody (GE Healthcare), depending on the origin of the primary antibody. All antibody dilutions were carried out in 1% bovine serum albumin (BSA) in Tris-buffered saline-Tween 20. Bound antibodies were detected by enhanced chemiluminescence detection (Millipore).

The antibodies used in this study were mouse anti-ADAMTS1 monoclonal antibody (1:1,000), mouse anti-NFATc1 monoclonal antibody (1:500), rabbit anti-NFATc3 polyclonal antibody (1:1,000), and rabbit anti-NFATc4 polyclonal antibody (1:1,000) (all from Santa Cruz), mouse anti-human Cox-2 monoclonal antibody (Cayman; 1:4,000), rabbit anti-mouse Cox-2 polyclonal antibody (Cayman; 1:1,000), rabbit anti-C/EBP $\beta$  polyclonal antibody (Santa Cruz; 1:1,000), rabbit phospho-specific anti-C/EBP $\beta$  polyclonal antibody (Cell Signaling; 1:1,000), rabbit anti-CNA polyclonal antibody (Chemicon, Ab-1695; 1:1,000), mouse anti-CNB monoclonal antibody (Upstate; 1:4,000), rabbit anti-RCAN1 polyclonal antibody (Sigma; 1:500), mouse antitubulin monoclonal antibody (Sigma; 1:40,000), mouse anti-glyceraldehyde phosphate dehydrogenase monoclonal antibody (Abcam; 1:10,000), and mouse anti-polypyrimidine tract-binding protein-associated splicing factor (anti-PSF) monoclonal antibody (Sigma; 1:1,000).

**Reverse transcription and RT-qPCR analysis.** RNA was extracted with the TriPure kit (Roche) and cDNA synthesis was performed with 2  $\mu$ g of total RNA (16). Quantification of RNA levels was carried out by real-time quantitative PCR (RT-qPCR) with the following TaqMan assays (Applied Biosystems): human *ADAMTS-1* (Hs00199608\_m1), human *TFCR* (Hs00951083\_m1), mouse *Adamts-1* (Mm00607939\_s1), and mouse *Hprt1* (Mm00446968\_m1). RT-qPCR assays were performed as described previously (16). Analysis of RT-qPCR data was carried out by the comparative  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method.

**Plasmids.** Luciferase-based reporter vectors containing the human *ADAMTS-1* proximal promoter region  $-706/+207$  and  $-342/+207$  (18) were generously provided by Y. Ninomiya (Okayama University, Okayama, Japan). To generate pMetLuc ( $-274/+207$ ), the corresponding region of the *ADAMTS-1* promoter was amplified by PCR with Adamts-1 hPromoter  $-274$  sense and Adamts-1 hPromoter  $+207$  antisense oligonucleotides and cloned into pMet-Luc (Clontech). To generate luciferase-based reporter vectors containing the  $-539/+41$  and  $-269/+41$  regions of the murine *Adamts-1* promoter, the corresponding regions were amplified by PCR from mouse genomic DNA isolated from MLECs as a template with either Adamts-1 mPromoter  $-539$  sense or Adamts-1 mPromoter  $-269$  sense oligonucleotides in combination with the Adamts-1 mPromoter  $+41$  antisense primer. Amplified products were cloned into pGL3-Basic (Promega), generating plasmids pGL3( $-539/+41$ ) and pGL3( $-269/+41$ ), respectively. Construct pGL3( $-325/+41$ ) was generated by digestion of pGL3( $-539/+41$ ) with PstI and XhoI and subcloning into pGL3-Basic. The oligonucleotides used for cloning were Adamts-1 hPromoter  $+207$  antisense (5'-GCAGGCAGAGTGGCTC-3'), Adamts-1 hPromoter  $-274$  sense (5'-CGGTGGAAGGGAGAGTC-3'), Adamts-1 mPromoter  $-539$  sense (5'-GGTACCGAGAAGCGCAGAATCAAC-3'), Adamts-1 mPromoter  $-269$  sense (5'-GGTACCCCGAGAGATGAAGTTAAAGG-3'), and Adamts-1 mPromoter  $+41$  antisense (5'-CTCGAGCTTGCGATAGCACCTAG-3').

Site-directed mutagenesis was performed with the QuikChange mutagenesis kit (Stratagene). The fidelity of all amplified products was confirmed by sequencing. The oligonucleotides used for site-directed mu-

tagenesis were (the mutated positions are underlined) GGGGAGAAAAG GAATGTCGAGGTTTCTTTTCAATTTCGACC (to mutate the C/EBP $\beta$  binding site at position  $-365$  of the murine promoter region), CAGG ATAGGGAAATGTCGAAAGTTGGGACTGCGTTCTCC (to mutate the C/EBP $\beta$  binding site at position  $-410$  of the human promoter region), GTGGGGAGGAAGGGTGTGTAGGAAACCGGCGAGG (to mutate the binding site for NFAT at position  $-302$  of the human promoter region), GGGGAGGAAGGGTGGTCCATTACCGGCGAGG (to mutate the binding site for NFAT at position  $-294$  of the human promoter region), and GAGGAAGGGTGTGTATTAACCGGCGAGGGAGA AAAG (to mutate both binding sites for NFAT at positions  $-302$  and  $-294$  of the human promoter region).

**Transient transfection and luciferase assay.** HUVECs ( $5 \times 10^4$ ) were transfected with 0.6  $\mu$ g of luciferase reporter vector by the calcium phosphate method (15). Murine VSMCs ( $10^5$ ) were transfected with 0.6  $\mu$ g of luciferase reporter vector with Lipofectamine (16). In cotransfection experiments, pcDNA3.1-LIP or the pcDNA3.1-Empty control expression vector was transfected together with the corresponding luciferase reporter plasmid at a ratio of 3:1. Differences in cell survival or changes in global translation rate due to different treatments were ruled out through the parallel transfection of the corresponding empty luciferase vector (basal activity, 10,000 to 30,000 relative light units). Luciferase activity was measured with the luciferase assay kit (Promega) or the Ready to Glow kit (Clontech) for pGL3- or pMetLuc-derived plasmids, respectively.

**Formaldehyde cross-linking and ChIP assays.** Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays were performed essentially as described previously (19). HUVECs ( $1.5 \times 10^7$ ) were stimulated with 50 ng/ml VEGF or  $10^{-5}$  M Ang-II for 30 min and then fixed with 1% formaldehyde for 5 min at 4°C. Fixation was quenched by the addition of 0.125 M glycine and incubation for 10 min at 4°C. Cells were washed three times with cold phosphate-buffered saline (PBS) and scraped into PBS containing proteinase inhibitors. After a centrifugation step, cells were suspended in lysis buffer 1 (50 mM HEPES-KOH [pH 7.5], 1 mM EDTA, 10% glycerol, 0.5% NP-40, 0.25% Triton X-100, 140 mM NaCl, proteinase inhibitors) for 10 min at 4°C. Nuclear pellets were washed in lysis buffer 2 (10 mM Tris-HCl [pH 8], 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA), lysed in lysis buffer 3 (10 mM Tris-HCl [pH 8], 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 0.5% SDS), and sonicated with a Bioruptor sonicator (Diagenode). Before immunoprecipitation, the size of DNA fragments was confirmed to be 200 to 600 bp by reverse cross-linking (3 volumes of Tris-EDTA [TE] buffer and 0.3 M NaCl at 65°C overnight) of an aliquot of chromatin sample and subsequent electrophoresis in a 2% agarose gel. A portion (5%) of the total chromatin sample was saved for input detection. For each immunoprecipitation, 50  $\mu$ l of protein A Dynabeads (Invitrogen) was blocked with 0.5% BSA-PBS for 1 h and incubated overnight in 0.5% BSA-PBS with 6  $\mu$ g of control mouse or rabbit IgG (Santa Cruz), a rabbit anti-C/EBP $\beta$  polyclonal antibody (Santa Cruz), or an anti-NFATc1 monoclonal antibody (kindly provided by T. Minami, Research Center for Advanced Science and Technology, University of Tokyo, Tokyo, Japan). Chromatin was diluted 1/6 in TE buffer containing 50 mM NaCl and 1% Triton X-100 (Sigma) and incubated with rocking overnight at 4°C with antibody-coupled Dynabeads. The beads were washed three times with low-salt washing buffer (20 mM Tris-HCl [pH 8], 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 0.3% sarcosyl, 0.5% sodium deoxycholate), three times with high-salt buffer (20 mM Tris-HCl [pH 8], 2 mM EDTA, 500 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% SDS), three times with high-salt radioimmunoprecipitation assay buffer (20 mM Tris-HCl [pH 7.5], 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate), and twice with TE buffer containing 150 mM NaCl. Finally, chromatin bound to Dynabeads was eluted in 200  $\mu$ l of 10 mM Tris-HCl [pH 8]–10 mM EDTA–2% SDS buffer by rocking at 65°C for 45 min, followed by vortexing for 5 min. Reverse cross-linking was performed by incubation with 600  $\mu$ l of TE buffer containing 300 mM NaCl at 65°C overnight. DNA samples were treated with 0.2  $\mu$ g/ml RNase (Sigma-Aldrich) for 1 h at 37°C and 0.2  $\mu$ g/ml proteinase K (Sigma-Aldrich) for 1 h

at 50°C. DNA was extracted with phenol-chloroform, precipitated, and resuspended in 50  $\mu$ l of water. One-third of the final volume was analyzed by Sybr green real-time PCR with the oligonucleotides ADAMTS-1 promoter C/EBP $\beta$  site (sense, CCTAGTCATCTCCTAGATTG; antisense, GGTTTCGGTTGGAGAACGC), ADAMTS-1 NFAT sites (sense, GGAAGGGTGGTCCAGGAAA; antisense, CGCCACTGCTCGTCAATC), ADAMTS-1 3' UTR (sense, GACAAGTGATCTCAATGTCCCC; antisense, GAGCTTAGTACCTCCAATTCCCT), and COX-2 promoter (sense, GGTTTCCGATTTTCTCATTCCG; antisense, CACTGCAAGTGTATGCAATTG).

**Animals.** Animal studies were performed in accordance with the guidelines of the European Union on animal care and approved by the Animal Care and Ethics committee at the Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares. Calcineurin (CN) B1 (*Cnbl<sup>Δ/Δ</sup>*) conditional knockout mice (20) were kindly provided by Gerald R. Crabtree (Howard Hughes Medical Institute, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA). Mice were administered VEGF or Ang-II by subcutaneous osmotic minipump (Alzet Corp) infusion at 25  $\mu$ g/kg/day and 1  $\mu$ g/kg/min, respectively. Where indicated, minipumps loaded with CsA (Novartis; 5 mg/kg/day) were implanted 24 h before VEGF or Ang-II administration. The AT<sub>1</sub>R blocker losartan (Fluka) was administered at 10 mg/kg/day by minipumps implanted 24 h before the administration of Ang-II.

**Lentivirus production and infection.** Lentivirus production was performed as described previously (16). Lentiviruses encoding Cre recombinase, green fluorescent protein (GFP)-LXVP, and GFP-LXVP Mutant have been previously described (21, 22). Lenti-LIP, a lentivirus encoding LIP (liver inhibitor protein), was generated by subcloning mouse C/EBP $\beta$  (LIP) from pcDNA3.1-C/EBP $\beta$  (LIP) (a gift from Peter Johnson; Addgene plasmid 12561) into lentiviral plasmid pHRISIN-IRES-GFP. VSMCs, HUVECs, and MLECs were infected at a multiplicity of infection of 3.

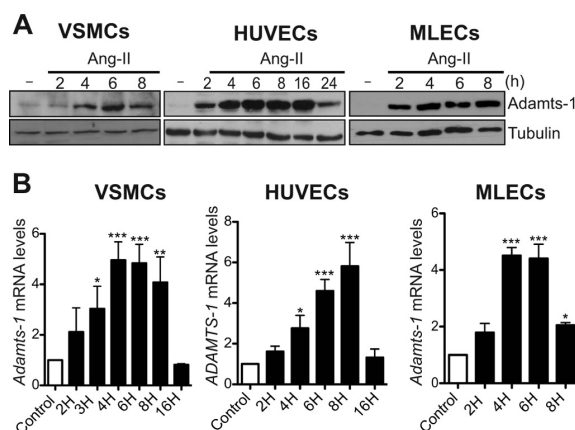
**Histological analysis.** Aortas were fixed in 4% paraformaldehyde overnight at 4°C. Paraffin cross sections (5  $\mu$ m) from fixed aortas were used for immunohistochemistry analysis. Heat-induced epitope retrieval was performed in citrate buffer (10 mM sodium citrate [pH 6], 0.05% Tween 20) at 125°C for 5 min. The antibodies used for immunohistochemistry analysis were anti-C/EBP $\beta$  (1/100; Santa Cruz Biotechnology), anti-p-C/EBP $\beta$  (1/25; Cell Signaling), rabbit polyclonal anti-Adams-1 (1/100; Santa Cruz), and anti-NFATc4 (1/100; Santa Cruz). Substrate staining was developed with diaminobenzidine (Vector Laboratories), and sections were counterstained with hematoxylin, dehydrated, and mounted in DPX (Fluka).

**Statistical analysis.** Results are expressed as mean values  $\pm$  standard deviations (SD). Differences were evaluated by one-way analysis of variance with the *post hoc* Newman-Keuls comparison test. Statistical significance was assigned at *P* values of <0.05.

## RESULTS

**Different signal transduction pathways regulate VEGF- and Ang-II-induced Adams1 gene expression in vascular cells.** Because Adams-1 expression increases in response to the activation of ECs with VEGF (12) and shear stress (13, 14), we hypothesized that other extracellular inducers of vascular remodeling may also regulate Adams-1 expression. We used Ang-II to test this hypothesis. Treatment of HUVECs, murine VSMCs, and MLECs with Ang-II resulted in a strong increase in Adams-1 protein and mRNA levels (Fig. 1A and B), with maximal expression occurring at approximately 6 h poststimulation.

Because VEGF and Ang-II activate the CN/nuclear factor of activated T cells (NFAT) signaling pathway in ECs and VSMCs (16, 23, 24), we investigated the involvement of this pathway in the upregulation of the *Adams-1* gene by these stimuli. Vascular cells were preincubated with the CN inhibitor CsA (25), and Adams-1 expression was analyzed by Western blot and RT-qPCR analyses. VEGF-dependent upregulation of Adams-1 expression at the

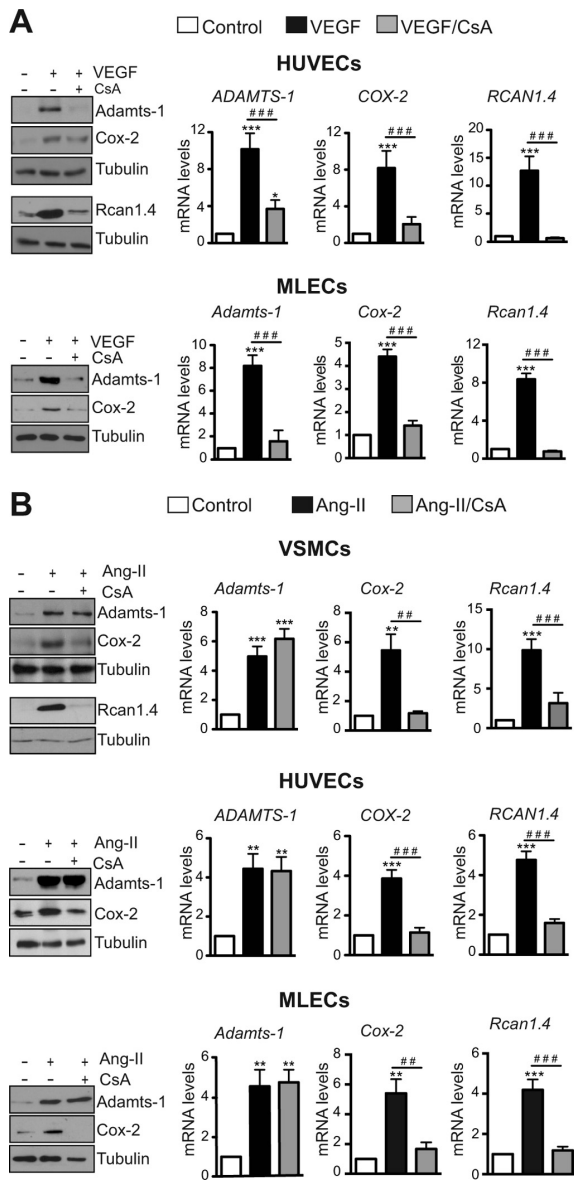


**FIG 1** Ang-II induces the expression of Adams-1 in vascular cells. (A) Western blot analysis of Adams-1 expression in protein extracts from primary VSMCs, HUVECs, and MLECs stimulated with Ang-II. (B) *Adams-1* gene expression was measured by qPCR in VSMCs, HUVECs, and MLECs treated with Ang-II as indicated. Values are expressed as fold increases relative to nonstimulated cells (Control). Histograms represent means  $\pm$  SD of at least three independent experiments. \*, *P* < 0.05; \*\*, *P* < 0.01; \*\*\*, *P* < 0.001 (versus the control).

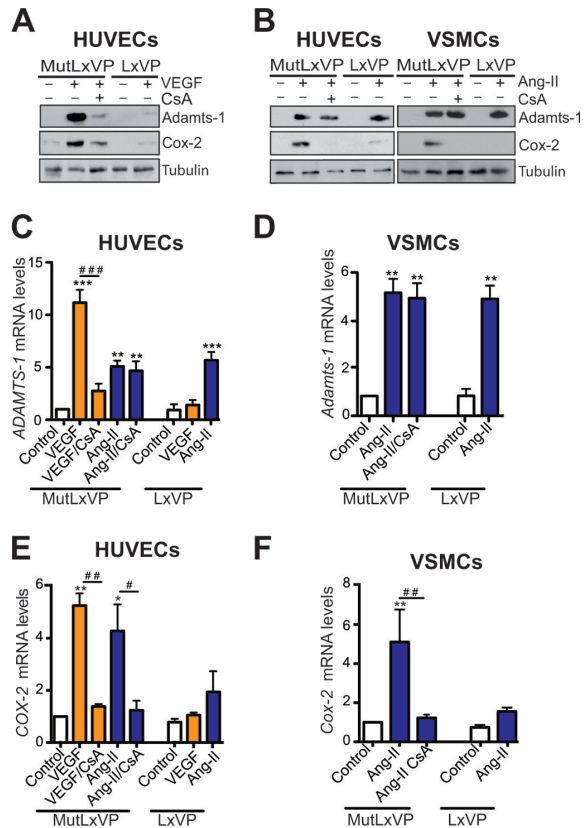
mRNA and protein levels was markedly reduced by inhibition of the CN/NFAT pathway with CsA (Fig. 2A). In contrast, induction of Adams-1 expression in response to Ang-II was unchanged in the presence of CsA (Fig. 2B), despite efficient blockade of CN signaling by CsA, as confirmed by CsA-mediated inhibition of the genes for cyclooxygenase 2 (Cox-2) and RCAN1.4 (Fig. 2), two known CN/NFAT targets (19, 24). These results suggest that CN signaling is implicated in VEGF-dependent induction of Adams-1 expression but not in Ang-II-promoted Adams-1 upregulation.

In addition to inhibiting CN, CsA can exert additional effects on the cell, such as activation of the transforming growth factor  $\beta$ 1 pathway (26) or stabilization of the RNA encoding VEGF (27). To confirm that the CsA-mediated reduction of Adams-1 expression by VEGF was not the result of off-target effects of CsA, we transduced ECs and VSMCs with lentiviral vectors encoding LXVP, a peptide that inhibits CN phosphatase activity and blocks its docking site for NFAT (28). Consistent with the data obtained with CsA, LXVP expression in vascular cells abrogated *Adams-1* gene upregulation in response to VEGF, but not in response to Ang-II (Fig. 3A to D). As expected, the LXVP peptide inhibited Cox-2 upregulation induced by both stimuli (Fig. 3A, B, E, and F), demonstrating efficient impairment of CN signaling in all cases, whereas an LXVP mutant had no effect on either Adams-1 or Cox-2 upregulation by these stimuli (Fig. 3A to F). The participation of CN-independent signal transduction pathways in the regulation of Adams-1 expression by Ang-II led us to investigate whether other stimuli that operate in a CN-independent fashion, such as the proinflammatory cytokines TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , might also induce Adams-1. Stimulation of HUVECs and VSMCs with TNF- $\alpha$  or IL-1 $\beta$  led to a time-dependent increase in Adams-1 levels in both cell types, peaking at 6 to 8 h poststimulation (Fig. 4A and B). CN inhibition with CsA or the LXVP peptide failed to block TNF- $\alpha$ - or IL-1 $\beta$ -induced upregulation of Adams-1 ex-

Oller et al.



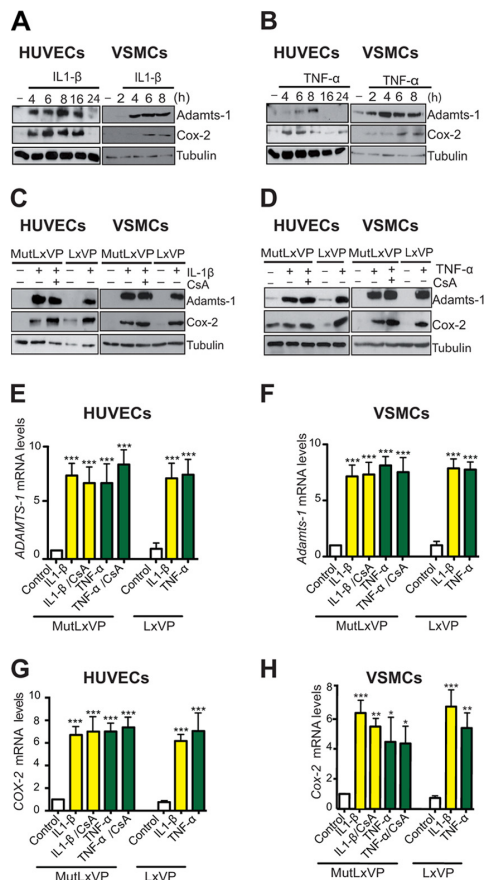
**FIG 2** Ang-II and VEGF upregulate *Adams-1* expression in vascular cells via differential signaling mechanisms. Western blot and qPCR analyses of *Adams-1*, *Cox-2*, and *RCAN1.4* expression in HUVECs and MLECs treated with CsA or the vehicle 1 h before stimulation with VEGF for 4 h (A) and VSMCs, HUVECs, and MLECs treated with CsA or the vehicle 1 h before stimulation with Ang-II for 4 h (B). In all Western blot assays, the expression of tubulin was analyzed as a loading control. The immunoblot assays shown are representative of three independent experiments. In qPCR analyses, mRNA levels were normalized to hypoxanthine phosphoribosyltransferase expression. Data are expressed as fold increases relative to nonstimulated cells (Control) and shown as means  $\pm$  SD of three independent experiments. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$  (versus control); ##,  $P < 0.01$ ; ###,  $P < 0.001$  (versus CsA-pretreated cells).



**FIG 3** Blockade of CN activity with the NFAT-derived peptide LXVP inhibits *Adams-1* upregulation by VEGF but not Ang-II in vascular cells. (A and B) Western blot analysis of *Adams-1* and *Cox-2* expression in the indicated vascular cells transduced with lentiviral particles expressing GFP tagged with the CN inhibitory peptide LXVP (LxVP) or a mutant version unable to inhibit CN (MutLxVP). Infected cells were stimulated with VEGF (A) or Ang-II (B) for 4 and 6 h, respectively, in the absence or presence of CsA as indicated. Tubulin expression was analyzed as a loading control. The immunoblot assays shown are representative of at least two independent experiments. (C to F) *Adams-1* (C and D) and *Cox-2* (E and F) mRNA expression was measured by qPCR in cells infected with lentiviruses as described above and stimulated as indicated. Values are expressed as fold increases relative to nonstimulated cells (Control). Data are shown as means  $\pm$  SD of three independent experiments. \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$  (versus the control); #,  $P < 0.05$ ; ##,  $P < 0.01$ ; ###,  $P < 0.001$  (versus CsA-pretreated cells).

pression (Fig. 4C to F), suggesting that activation of the CN/NFAT pathway is not involved in this regulation. In parallel, we measured *Cox-2* expression as a positive control for CN-independent TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  stimulation (24). As anticipated, *Cox-2* induction by TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  was unaltered by inhibition of the CN/NFAT pathway (Fig. 4A to D, G, and H).

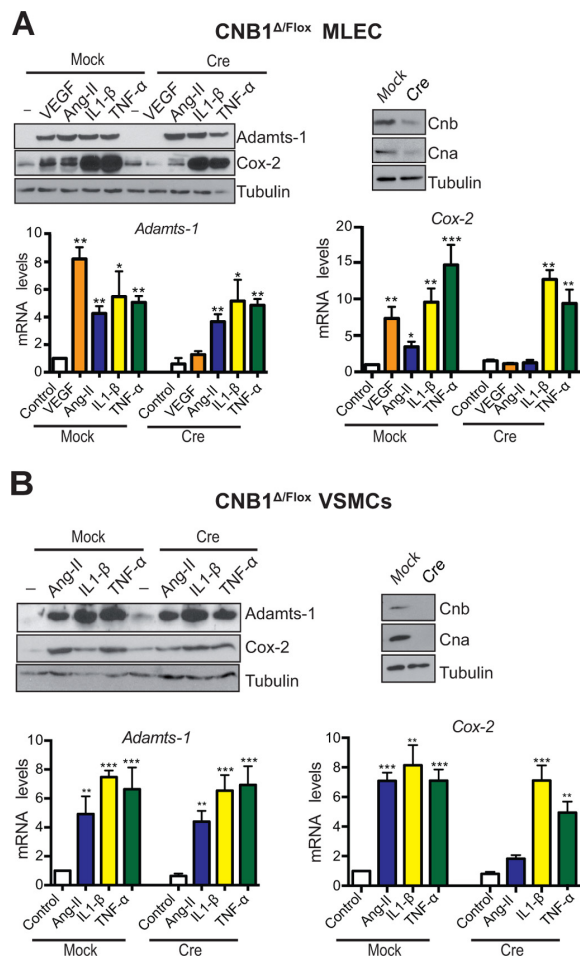
Finally, to further confirm the involvement of CN-dependent and -independent transduction mechanisms in the regulation of *Adams-1* gene expression, we employed cells lacking CN. MLECs and VSMCs isolated from a conditional CN knockout mouse (20) were transduced with a lentivirus expressing Cre recombinase (Lenti-Cre) to promote deletion of the *Cnb1* gene. As shown in Fig. 5, *Cnb1* deletion led to the destabilization of CN A in both cell



**FIG 4** Upregulation of *Adams-1* gene expression by the proinflammatory stimuli TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  does not require CN activation. (A to D) Western blot analysis of *Adams-1* and *Cox-2* expression in vascular cells treated with IL-1 $\beta$  (A) or TNF- $\alpha$  (B) for the times indicated. (C and D) HUVECs and VSMCs were transfected with lentiviral particles expressing GFP tagged with the CN inhibitory peptide LXVP (LxVP) or a mutant version unable to inhibit CN (MutLxVP). Cells were stimulated with IL-1 $\beta$  (C) or TNF- $\alpha$  (D) for 6 h in the absence or presence of CsA as indicated. In all cases, tubulin expression was analyzed as a loading control. The immunoblot assays shown are representative of at least two independent experiments. (E to H) *Adams-1* and *Cox2* mRNA expression was measured by qPCR in HUVECs (E and G) or VSMCs (F and H) infected with lentiviruses as described above and stimulated as indicated. Values are expressed as fold increases relative to nonstimulated cells (Control). Data are shown as means  $\pm$  SD of three independent experiments. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$  (versus the control).

types. VEGF stimulation was no longer able to induce *Adams-1* or *Cox-2* gene expression in CN-deficient MLECs (Fig. 5A). In contrast, *Adams-1* upregulation by Ang-II, TNF- $\alpha$ , or IL-1 $\beta$  was unaffected by disruption of CN expression (Fig. 5). Consistent with the data obtained with CN inhibitors (Fig. 2 to 4), whereas *Cox-2* induction by TNF- $\alpha$  or IL-1 $\beta$  was unaltered by CN deletion, *Cox-2* upregulation by Ang-II was largely abolished in CN-deficient vascular cells (Fig. 5).

Collectively, these results indicate that stimulation of vascular cells induces *Adams-1* gene expression via the activation of at least two different intracellular signaling pathways. Whereas



**FIG 5** CN deletion impairs *Adams-1* upregulation by VEGF but not Ang-II, TNF- $\alpha$ , or IL-1 $\beta$ . To suppress CN expression in primary vascular cells, MLECs (A) and VSMCs (B) isolated from *Cnb1 $\Delta$ /Flox* mice were infected with lentiviruses expressing the Cre recombinase (Cre) or GFP as a control and then stimulated as indicated. CN deficiency was assessed by Western blot analysis with antibodies specific for the CN B (Cnb) or A (Cna) subunit. *Adams-1* and *Cox-2* protein levels were determined by Western blotting. In all cases, the expression of tubulin was analyzed as a loading control. Immunoblot assays are representative of at least three independent experiments. *Adams-1* and *Cox2* mRNA expression was measured by qPCR in CN-deficient MLECs (A) or VSMCs (B) stimulated as indicated. Values are expressed as fold increases relative to nonstimulated cells (Control). Data are shown as means  $\pm$  SD of three independent experiments. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$  (versus the control).

VEGF-dependent upregulation of *Adams-1* requires CN activity, Ang-II, TNF- $\alpha$ , and IL-1 $\beta$  operate through the activation of an alternative signaling mechanism.

***Adams-1* gene upregulation requires the binding of either NFAT or C/EBP $\beta$  to specific sequences located in its promoter region.** To identify the transcription factors that link signal transduction processes in vascular cells with upregulation of *Adams-1* gene expression, we transfected HUVECs and VSMCs with luciferase-based reporter constructs containing the proximal

Oller et al.

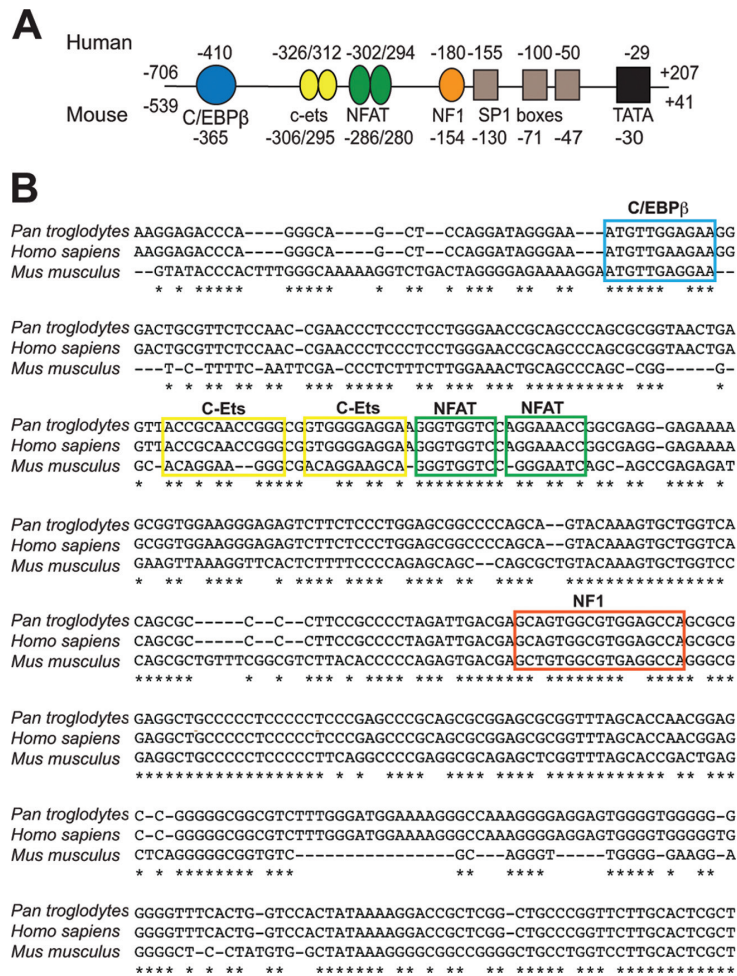


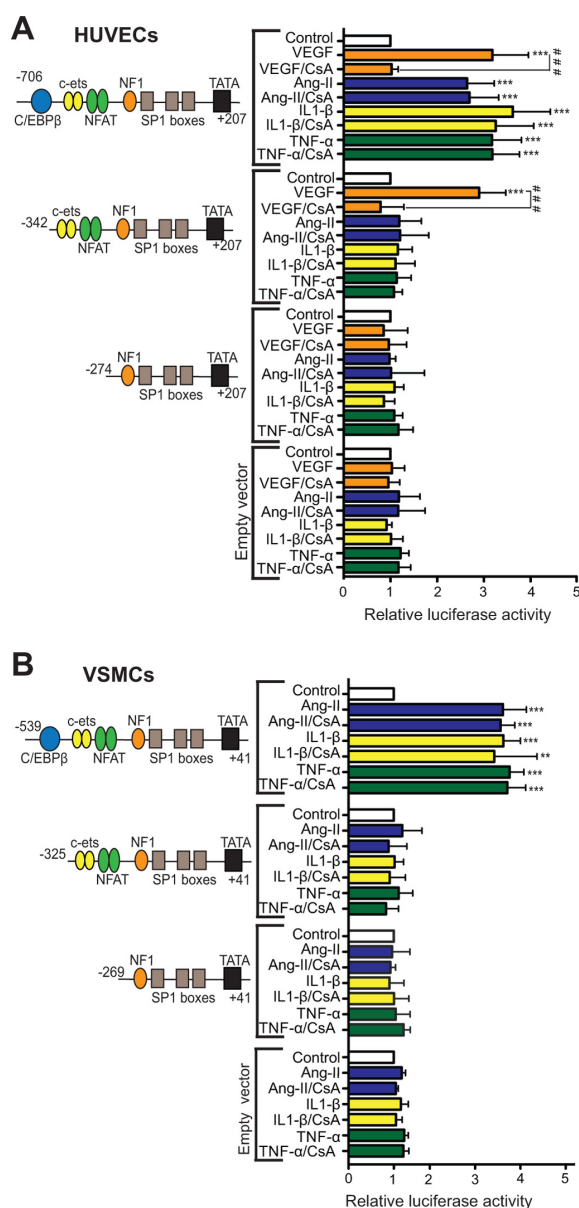
FIG 6 Sequence and putative regulatory elements of the *Adamts-1* proximal promoter region. (A) Diagram depicting putative *cis*-acting regulatory elements in the human and mouse promoter regions of *Adamts-1*. (B) Alignment of the proximal regions of the human (*Homo sapiens*), mouse (*Mus musculus*), and chimpanzee (*Pan troglodytes*) *Adamts-1* gene promoters. Nucleotides identical in the three species are indicated by stars. Putative transcription factor binding sites are boxed.

promoter regions of *Adamts-1*, pMetLuc(-706/+207) and pGL3(-539/+41), for the human and murine genes, respectively (Fig. 6). The presence of binding motifs for the transcription factors C/EBPβ, c-ets, NF-1, and SP1 in the *Adamts-1* proximal promoter (Fig. 6) has been previously reported (29), but no binding sites for NFAT have yet been identified in this region. A detailed *in silico* analysis of the human *ADAMTS-1* proximal promoter sequence revealed two potential NFAT binding sites at positions -302 and -294, corresponding to nucleotides -286 and -280 in the murine promoter (Fig. 6).

Stimulation of the transfected cells with VEGF, Ang-II, IL-1β, or TNF-α resulted in a significant increase in luciferase activity of the *Adamts-1* reporter vectors (Fig. 7), suggesting that this promoter region contains regulatory elements that mediate its transcriptional activation by these stimuli. In agreement with our results on protein and mRNA induction (Fig. 2), pretreat-

ment of the transfected cells with CsA abolished the activation of the reporter in response to VEGF but not that in response to Ang-II, IL-1β, or TNF-α (Fig. 7). These results suggest that the -706/+207 region of human *ADAMTS-1* (-539/+41 in the mouse) contains CN-dependent and -independent regulatory elements that respond to stimulation by VEGF and Ang-II, IL-1β, or TNF-α, respectively.

We generated a series of deletion-containing versions of the promoter constructs to determine the functional relevance of the transcription factor-binding motifs identified in the *ADAMTS-1* proximal promoter. Deletion of the region encompassing the C/EBPβ-binding motif failed to alter the luciferase activity of the reporter vector in response to VEGF stimulation in HUVECs (Fig. 7A). Accordingly, preincubation of the cells with CsA prior to VEGF stimulation substantially inhibited the reporter activity of this construct (Fig. 7A). Conversely, loss of this region completely



**FIG 7** Functional analysis of *Adams1* promoter activity in response to VEGF, Ang-II, TNF- $\alpha$ , and IL-1 $\beta$ . HUVECs (A) or murine VSMCs (B) were transfected with luciferase-based reporter plasmids containing serial deletions of the human (A) or mouse (B) *Adams1* promoter region. Transfected cells were left unstimulated (Control) or stimulated with VEGF, Ang-II, IL-1 $\beta$ , and TNF- $\alpha$  for 8 h. Where indicated, cells were treated with CsA for 1 h prior to stimulation. Luciferase activity is expressed as fold increases relative to the activity of the reporter in nonstimulated cells. Empty plasmids pMetLuc and pGL3 were used as negative controls. Histograms show data as means  $\pm$  SD of at least five independent experiments. \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$  (versus nonstimulated cells); ###,  $P < 0.001$  (VEGF versus VEGF/CsA-stimulated cells).

blunted the upregulation of reporter gene activity in cells treated with Ang-II, IL-1 $\beta$ , or TNF- $\alpha$  (Fig. 7).

Further removal of the region containing the two potential binding sites for NFAT completely abrogated the VEGF-stimulated increase in reporter activity (Fig. 7A). As expected, this construct and the equivalent murine construct did not respond to Ang-II, TNF- $\alpha$ , or IL-1 $\beta$  treatment (Fig. 7). These results demonstrate that the  $-706/-343$  region of the human *ADAMTS-1* promoter ( $-539/-326$  in the mouse) contains CN-unrelated regulatory elements that control the transcriptional activation of the gene in response to Ang-II, TNF- $\alpha$ , and IL-1 $\beta$ , whereas the  $-342/-275$  fragment ( $-325/-270$  in the mouse) regulates VEGF-induced *Adams1* expression in a CN-dependent fashion.

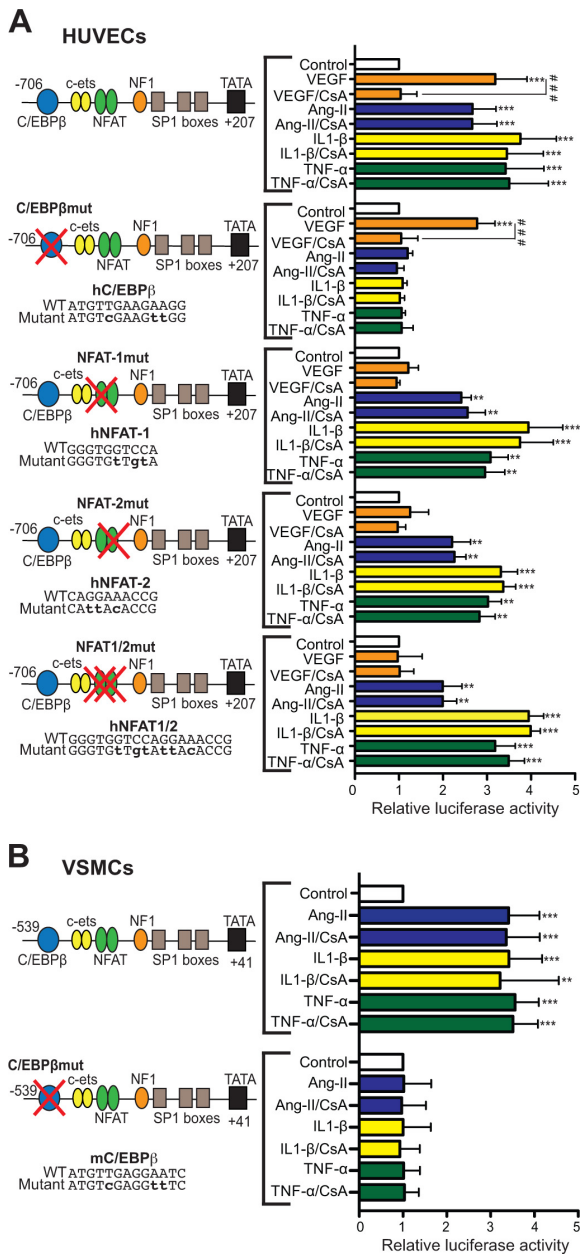
To test the possibility that the C/EBP $\beta$  and NFAT putative binding sites were implicated in *Adams1* promoter activation, we mutated these sequences and analyzed their transcriptional contribution by using luciferase reporter assays. Mutation of the C/EBP $\beta$ -binding site blunted the response of the human and mouse *Adams1* promoters to Ang-II, TNF- $\alpha$ , and IL-1 $\beta$  stimulation but did not affect their activation by VEGF (Fig. 8). Conversely, mutation of the two putative NFAT binding sites (either individually or together) blocked the transcriptional response to VEGF but not that to Ang-II, TNF- $\alpha$ , or IL-1 $\beta$  (Fig. 8A).

We next performed ChIP analysis to evaluate the functional occupancy of these motifs by the transcription factors C/EBP $\beta$  and NFAT in the endogenous *ADAMTS-1* promoter. ChIP assays of Ang-II-stimulated HUVECs with an antibody specific for C/EBP $\beta$  confirmed the recruitment of this factor (Fig. 9A). An identical experiment with an antibody specific for NFATc1 did not result in coprecipitation of the promoter region encompassing the NFAT binding sites (Fig. 9B), indicating that stimulation with Ang-II induces binding of C/EBP $\beta$  but not NFATc1 to the *ADAMTS-1* promoter. In contrast, ChIP assays of HUVECs stimulated with VEGF revealed the interaction of NFATc1 but not C/EBP $\beta$  with the corresponding promoter binding sites (Fig. 9A and B). Importantly, negative-control ChIP assays with anti-C/EBP $\beta$  or anti-NFATc1 antibodies on the 3' untranslated region (UTR) of the *Adams1* mRNA excluded the possibility of coprecipitation of nonspecific DNA sequences (Fig. 9A and B). As a positive control, the *COX-2* promoter region was amplified in parallel in a ChIP assay to demonstrate C/EBP $\beta$  and NFATc1 recruitment upon Ang-II and/or VEGF treatment (Fig. 9C).

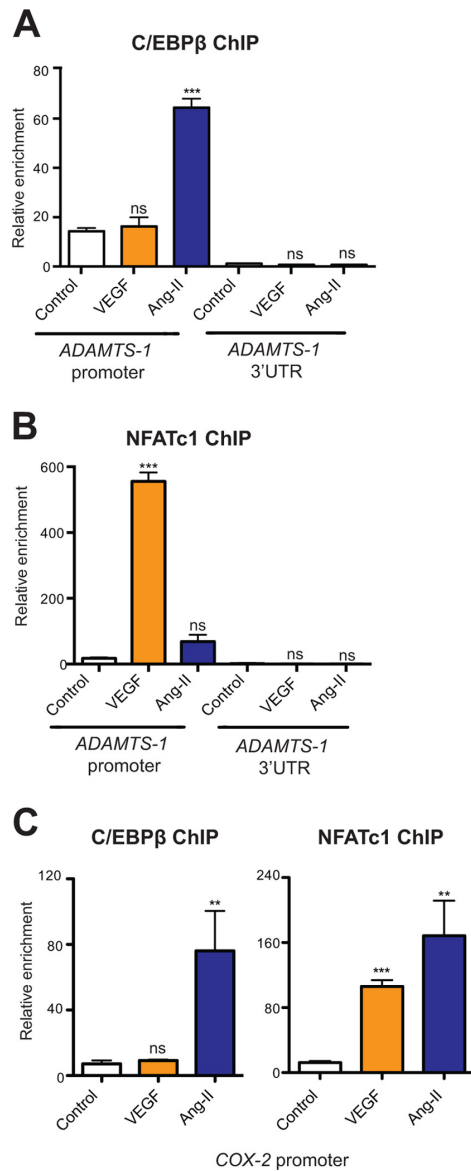
Taken together, these results establish the presence of functional binding sites for the transcription factors C/EBP $\beta$  and NFAT in the *ADAMTS-1* promoter region that play an essential role in the differential transcriptional activation of the gene in response to Ang-II/IL-1 $\beta$ /TNF- $\alpha$  or VEGF, respectively.

**Ang-II and proinflammatory cytokines regulate *Adams1* gene expression through C/EBP $\beta$ .** Alternative translation initiation sites in the C/EBP $\beta$  mRNA generate different protein isoforms designated LAP (liver activator protein) or LIP. LAP contains a conserved bZIP DNA-binding domain and a transactivation domain (and therefore is fully functional), whereas LIP lacks the transactivation domain and functions as a repressor (30). Phosphorylation of human C/EBP $\beta$ -LAP at residue Thr235 (Thr188 in the mouse) efficiently increases its transactivation activity (30). VSMCs stimulated with Ang-II resulted in a substantial increase in C/EBP $\beta$ -LAP phosphorylation at Thr235/188 after only 10 min of treatment, which persisted for 2 h (Fig. 10A). IL-1 $\beta$

Oller et al.

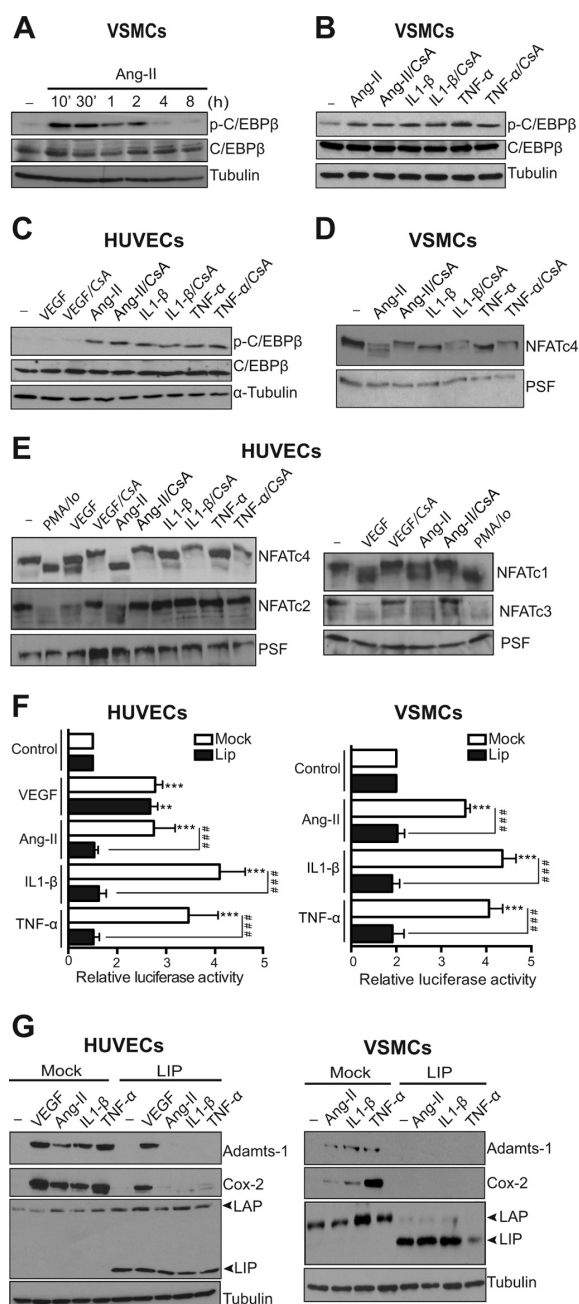


**FIG 8** Integrity of NFAT- and C/EBP $\beta$ -binding sites is essential for *Adamts1* promoter activity in response to VEGF and Ang-II, TNF- $\alpha$ , or IL-1 $\beta$ , respectively. Mutant versions of the reporter vectors pMetLuc (-706/+207) (A) and pGL3(-539/+41) (B), where the putative binding sites for C/EBP $\beta$  and NFAT were abolished by site-directed mutagenesis (base substitutions are in bold), were transfected in HUVECs (A) or murine VSMCs (B). Transfected cells were left untreated (Control) or stimulated with VEGF, Ang-II, IL-1 $\beta$ , or TNF- $\alpha$  for 8 h. Where indicated, cells were treated with CsA for 1 h prior to stimulation. Luciferase activity was expressed as fold increases relative to the activity of the reporter in nonstimulated cells. Histograms show data as means  $\pm$  SD of at least three independent experiments. \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$  (versus untreated cells); ###,  $P < 0.001$  (VEGF versus VEGF/CsA-stimulated cells).



**FIG 9** Recruitment of C/EBP $\beta$  and NFAT to the *Adamts-1* and *Cox-2* promoters is differentially induced by Ang-II and VEGF. ChIP assays of the promoter and 3' UTR of *Adamts-1* (A and B) and the *Cox-2* promoter (C) performed with HUVECs left unstimulated (Control) or treated with either VEGF or Ang-II for 30 min, with antibodies specific for C/EBP $\beta$  or NFATc1 as indicated. Data are shown as enrichment of the amount of chromatin precipitated with anti-C/EBP $\beta$  or anti-NFATc1 antibody relative to the values obtained with an IgG control antibody. Histograms show means  $\pm$  SD of three independent experiments. \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$  (versus the control); ns, nonsignificant.

and TNF- $\alpha$ , but not VEGF, induced a similar increase in C/EBP $\beta$ -LAP phosphorylation (Fig. 10B and C). Analysis of the protein extracts with an antibody recognizing total C/EBP $\beta$ -LAP showed equivalent C/EBP $\beta$ -LAP expression levels in all cases (Fig. 10A to



**FIG 10** Ang-II, IL-1 $\beta$ , and TNF- $\alpha$  upregulate *Adams-1* in a C/EBP $\beta$ -dependent manner. (A to C) Immunoblot analysis of phospho-C/EBP $\beta$  and total C/EBP $\beta$  in protein extracts of VSMCs treated with Ang-II for the times indicated (A) and VSMCs and HUVECs treated with Ang-II, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  or VEGF for 15 min (B and C). Where indicated, cells were treated with CsA for 1 h prior to stimulation. Tubulin expression was analyzed as a loading control. (D and E) VSMCs and HUVECs were treated with the indicated stimuli for 30 min, and the activation (dephosphorylation) status of NFATc1 to -c4 transcription factors was analyzed by Western blotting. Where indicated, cells were treated with CsA for 1 h prior to addition of the stimulus. PSF expression was

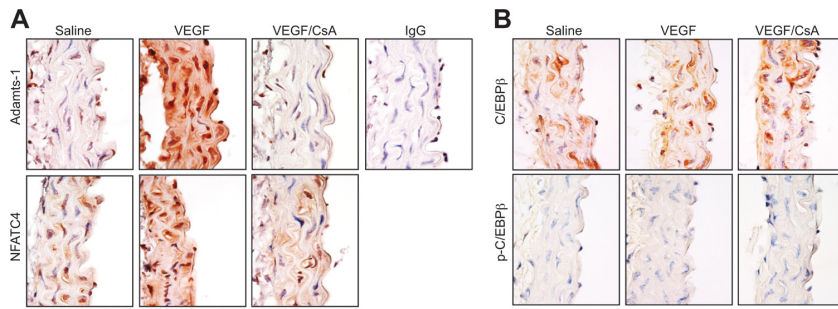
(C). Whereas both VEGF and Ang-II induced significant dephosphorylation of all NFAT family members, neither IL-1 $\beta$  nor TNF- $\alpha$  activated these transcription factors (Fig. 10D and E). As expected, the observed increase in C/EBP $\beta$ -LAP phosphorylation was not affected by preincubation of the cells with CsA (Fig. 10B and C), which efficiently inhibited VEGF- and Ang-II-induced dephosphorylation of NFAT family members (Fig. 10D and E). These results indicate that Ang-II, IL-1 $\beta$ , or TNF- $\alpha$ , but not VEGF, triggers the activation of the C/EBP $\beta$  signal transduction pathway in vascular cells.

Given these results, we hypothesized that Ang-II-, IL-1 $\beta$ -, or TNF- $\alpha$ -dependent activation of the C/EBP $\beta$  pathway is implicated in the transcriptional activation of the *Adams-1* gene. To explore this possibility, we cotransfected HUVECs or VSMCs with a luciferase reporter vector containing the *Adams-1* proximal promoter region together with an expression plasmid encoding the C/EBP $\beta$  repressor C/EBP $\beta$ -LIP (pcDNA3.1-LIP) or the corresponding empty vector and measured promoter activation after stimulation. Whereas ectopic expression of C/EBP $\beta$ -LIP robustly inhibited the induction of luciferase activity by Ang-II, IL-1 $\beta$ , or TNF- $\alpha$  stimulation, induction by VEGF was not significantly affected by C/EBP $\beta$ -LIP (Fig. 10F). Confirming these observations, upregulation of endogenous *Adams-1* protein expression in vascular cells stimulated with Ang-II, IL-1 $\beta$ , or TNF- $\alpha$  was impaired with a lentivirus encoding LIP (Fig. 10G), whereas LIP ectopic expression did not affect the levels of *Adams-1* expressed in VEGF-treated cells (Fig. 10G).

These results support a selective participation of C/EBP $\beta$  signaling in the upregulation of *Adams-1* expression in cells treated with Ang-II, IL-1 $\beta$ , or TNF- $\alpha$  but not in cells treated with VEGF.

**Regulation of *Adams-1* expression by VEGF and Ang-II in the aorta.** Given the importance of NFAT and C/EBP $\beta$  activation in the regulation of *Adams-1* expression by VEGF and Ang-II *in vitro*, we studied whether these pathways are also operative *in vivo*. To this end, we infused VEGF or Ang-II into C57BL/6 mice and analyzed *Adams-1* expression in the aortas of control and treated animals. VEGF treatment promoted NFAT nuclear translocation and subsequent induction of *Adams-1* expression in the aorta, which was sensitive to CsA pretreatment (Fig. 11A). In contrast, the phosphorylation status of C/EBP $\beta$  was not modified by VEGF infusion into the aortic wall (Fig. 11B). Similarly, the expression of *Adams-1* in protein lysates of aortas isolated from animals in-

analyzed as a loading control. Immunoblot assays are representative of three independent experiments. (F) HUVECs and VSMCs were cotransfected with an expression vector encoding the C/EBP $\beta$  inhibitory isoform (LIP) or the empty plasmid (Mock), together with a luciferase-based reporter vector containing the human or mouse *Adams-1* proximal promoter, pMetLucAdams-1(-706/+207), or pGL3mAdams-1(-539/+41), respectively. Transfected cells were left untreated (Control) or stimulated as indicated for 8 h. Luciferase activity was expressed as fold increases relative to the activity of the reporter in untreated cells. Histograms show data as means  $\pm$  SD of four independent experiments. \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$  (versus untreated cells); ###,  $P < 0.001$  (versus CsA-pretreated cells). (G) HUVECs or VSMCs were infected with lentiviral particles expressing GFP or C/EBP $\beta$ -LIP (LIP). Transduced cells were stimulated with Ang-II, IL-1 $\beta$ , or TNF- $\alpha$  for 6 h or with VEGF for 4 h, and *Adams-1* expression was analyzed by Western blotting. Successful expression of exogenous LIP was confirmed by Western blotting with an anti-C/EBP antibody that recognizes both the LAP and LIP isoforms of C/EBP $\beta$ . Cox-2 expression is shown as a positive control for stimulation, and tubulin is shown as a loading control. The immunoblot assays shown are representative of three independent experiments.



**FIG 11** VEGF induces Adamts-1 expression and NFAT activation in the murine aorta. Representative immunostaining ( $n = 3$ ) for Adamts-1 and NFATc4 (A) or total (C/EBP $\beta$ ) and phosphorylated (p-C/EBP $\beta$ ) C/EBP $\beta$  (B) proteins in aortic sections of mice treated with saline or VEGF at 25  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  for 3 days or 1 day, respectively. Where indicated, mice were treated with CsA at 10  $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$  for 1 day prior to VEGF administration. Bars, 20  $\mu\text{m}$ . Staining of aortic sections with an IgG antibody was performed as a negative control.

fused with Ang-II for 1 to 21 days increased markedly (Fig. 12A). Correspondingly, *Adamts-1* mRNA levels increased significantly after only 5 h of Ang-II infusion and remained elevated for 21 days (Fig. 12A). Consistent with our *in vitro* findings, CsA did not inhibit Adamts-1 upregulation by Ang-II in the aorta (Fig. 12B). Moreover, immunostaining of Adamts-1 in murine aortic tissue sections revealed a significant induction of its expression by Ang-II (Fig. 12C), further supporting our observations.

Immunohistochemistry analysis of aortic tissue sections revealed that C/EBP-LAP staining was mainly cytoplasmic in the vasculature of saline-infused control animals but partially translocated to the nucleus upon activation by Ang-II (Fig. 12D). Concomitant with nuclear translocation, Ang-II induced a notable increase in C/EBP-LAP phosphorylation at Thr188 (Fig. 12D). Both Ang-II-induced Adamts-1 upregulation and C/EBP $\beta$  activation were prevented by the AT $_1$  receptor inhibitor losartan (Fig. 12C and D). These results demonstrate that aortic Adamts-1 expression increases after *in vivo* VEGF and Ang-II treatment and suggest that NFAT and C/EBP $\beta$  may mediate Adamts-1 upregulation induced by these stimuli in the murine aorta.

Altogether, our data show differential usage of signaling pathways in the regulation of Adamts-1 expression by stimuli associated with vascular remodeling and that Ang-II induces *in vivo* C/EBP $\beta$  phosphorylation and nuclear translocation, which could be involved in Ang-II-mediated Adamts-1 induction *in vivo*.

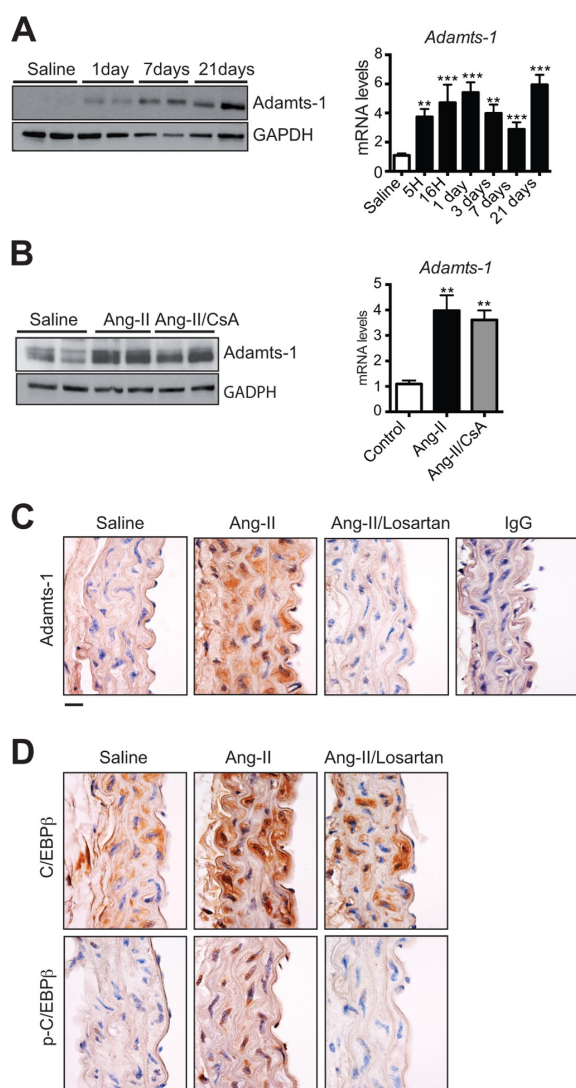
## DISCUSSION

Emerging evidence indicates that the metalloproteinase Adamts-1 plays an important role in the pathophysiology of vascular disorders (7, 8, 10), but the intracellular mechanisms that control Adamts-1 expression during these processes remain poorly understood. In this work, we show that vascular expression of Adamts-1 is induced by mediators of vascular remodeling, such as VEGF, Ang-II, and the proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ . We have also characterized the coupling of specific signaling pathways and transcription factor activation in the regulation of Adamts-1 expression by these stimuli.

Using different approaches to block the CN/NFAT signal transduction pathway, we have identified this pathway as a critical mediator of the transcriptional activation of *Adamts-1* induced by VEGF in ECs. Previous reports have shown that VEGF upregulates *Adamts-1* mRNA (12, 31) and that NFATc1 binds the *Adamts-1*

promoter upon VEGF treatment in ECs (32). Nevertheless, a detailed analysis of the transcriptional mechanisms involved in *Adamts-1* induction by VEGF had not been performed. Through our analysis, we have identified two novel NFAT binding sequences responsible for driving *Adamts-1* expression in response to VEGF. NFAT is known to activate transcription through functional cooperation with a variety of transcription factors, including AP1 (33, 34), CREB (35), FoxP3 (36), MyoD (37), and C/EBP $\beta$  (38); however, NFAT proteins may also bind DNA as monomers or dimers (39, 40). Thus, NFAT could be operating in our system without a heterologous partner, as is the case for TNF- $\alpha$  and IL-13 promoter activation (39). The possible requirement of NFAT dimers to mediate VEGF-induced *Adamts-1* expression would be in line with the abrogation of transcription upon the mutation of either NFAT site in the promoter. On the other hand, previous work has shown that VEGF upregulates endothelial Adamts-1 expression in a protein kinase C (PKC)-dependent manner (12). It is feasible that the increased expression of endothelial Adamts-1 triggered by VEGF requires the activation of both pathways. Accordingly, concomitant activation of CN and PKC signaling has been described during upregulation of the endothelial proteins RCAN1 to -4 (41, 42) and tissue factor (43) in activated ECs. Moreover, concerted activation of these two signaling pathways is a regulatory mechanism widely described for the regulation of gene expression in other cell types (44–46). Our data indicate that the CN/NFAT pathway not only participates in Adamts-1 induction by VEGF *in vitro* but is also required for VEGF-mediated Adamts-1 upregulation in the aortic wall (Fig. 11). In this context, we detected NFAT nuclear translocation and Adamts-1 induction in response to VEGF both in the endothelial layer and in VSMCs present in the tunica media. We cannot discard a paracrine effect exerted by an unidentified factor secreted by ECs, which activates the CN/NFAT pathway and Adamts-1 expression in VSMC in a secondary manner. Nonetheless, VEGF receptor expression in VSMCs *in vitro* and *in vivo* has been reported by several authors (47–50). VEGF might be therefore acting directly also on this cell type to promote Adamts-1 expression through the CN/NFAT pathway.

Stimulation of vascular cells *in vitro* and *in vivo* with Ang-II also induced a robust increase in the expression of Adamts-1, suggesting that this metalloproteinase is a molecular effector of Ang-II. Analogous to VEGF, Ang-II has been reported to trigger acti-



**FIG 12** Ang-II induces *Adams-1* expression and C/EBP $\beta$  activation in the murine aorta. (A) Representative immunoblot ( $n = 5$ ) and qPCR analyses of *Adams-1* expression in aortic extracts isolated from mice infused with saline or Ang-II ( $1 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ ) for the times indicated. Histograms show means  $\pm$  SD of three independent experiments. \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$  (versus the control). (B) *Adams-1* protein and mRNA expression was analyzed as described above in aortic samples isolated from mice infused with Ang-II for 3 days. Where indicated, mice were treated with CsA at  $10 \text{ mg}/\text{kg}/\text{day}$  for 1 day prior to Ang-II administration. Images are representative of four independent experiments. (C) Representative *Adams-1* immunostaining ( $n = 3$ ) of aortic sections from mice treated with saline or Ang-II for 3 days. Where indicated, animals were infused with losartan ( $10 \text{ mg}/\text{kg}/\text{day}$ ) for 1 day before Ang-II administration. Bar,  $20 \mu\text{m}$ . (D) Representative immunostaining ( $n = 3$ ) of total C/EBP $\beta$  or phosphorylated (p-C/EBP $\beta$ ) C/EBP $\beta$  proteins in aortic sections isolated from mice infused with Ang-II or saline for 1 day. Where indicated, animals were infused with losartan ( $10 \text{ mg}/\text{kg}/\text{day}$ ) for 1 day before Ang-II administration. Bar,  $20 \mu\text{m}$ .

vation of the CN/NFAT pathway in vascular cells (16). Thus, we initially inferred that activation of CN/NFAT signaling would drive the transcriptional upregulation of *Adams-1* by Ang-II. However, characterization of the intracellular pathways governing this process revealed a role for C/EBP $\beta$  proteins, and not for NFAT transcription factors. The C/EBP $\beta$ -binding sites in the *Adams-1* promoter have also been involved in its induction by progesterone receptor-mediated activation of granulosa cells (29), further supporting the relevance of C/EBP $\beta$  proteins in the regulation of *Adams-1* expression. Furthermore, active C/EBP $\beta$  proteins have been linked to the expression of other metalloproteinase proteins, including MMP-3, MMP-13, and *Adams-5*, during arthritic tissue remodeling (51, 52).

ChIP analysis revealed the differential binding of NFATc1 to the *Adams-1* promoter upon stimulation with VEGF or Ang-II (Fig. 9). The involvement of specific NFAT family members in the regulation of diverse target genes has been reported (19) and could underlie our data on the disparate role of NFAT on *Adams-1* transcriptional regulation by VEGF and Ang-II. Alternatively, differential activation kinetics or selective activation of NFATs might also account for the differential response mediated by VEGF and Ang-II. However, both factors activate all of the NFAT family members (Fig. 10D and E), and we cannot conclude that VEGF and Ang-II activate NFAT proteins to different extents because we have observed variability in the response to the treatments. This is probably due to variations in receptor expression among batches or passages of HUVECs. Another possibility is that VEGF and Ang-II trigger stimulus-dependent epigenetic modifications of NFAT family members, further influencing their transcriptional activity (53, 54).

The *Cox-2* promoter region also contains C/EBP $\beta$ - and NFAT-binding sites (24). Unlike VEGF, C/EBP $\beta$  activation is essential not only for *Adams-1* but also for *Cox-2* transcription induced by Ang-II, which is associated with functional occupancy of both C/EBP $\beta$ - and NFAT-binding motifs (Fig. 9C). It is well established that the C/EBP $\beta$  and NFAT transcription factors cooperate synergistically for DNA binding and gene activation (30, 55). Because the C/EBP $\beta$  and NFAT binding sites are in close proximity in the *Cox-2* promoter (24), both factors could hypothetically cooperate in *Cox-2* induction by Ang-II, as suggested by our functional data. Conversely, C/EBP $\beta$  could drive *Adams-1* transcription in response to Ang-II without functional cooperation with NFAT, which, as discussed above, would operate in a partner-independent manner upon VEGF activation. Hence, we hypothesize that cooperation with different partners might be responsible for the differential regulation of the *Adams-1* and *Cox-2* promoters by the NFAT and C/EBP $\beta$  transcription factors (Fig. 13).

Unlike ECs, LIP overexpression in VSMCs leads to a decrease in endogenous LAP expression. LIP lacks a transactivation domain and is known to impair C/EBP function either through competition for C/EBP DNA binding sites or by forming inactive heterodimers with other C/EBPs. In addition, cross talk between tyrosine kinase receptors and LAP/LIP isoforms has been described, which could act in some cases as a regulatory loop of LAP-LIP equilibrium (55). Accordingly, LIP overexpression might initiate a cell-type-dependent regulatory circuit that directly or indirectly modulates LAP expression.

Metalloproteinases regulate diverse aspects of inflammatory processes and immune responses, either through the release and

Oller et al.

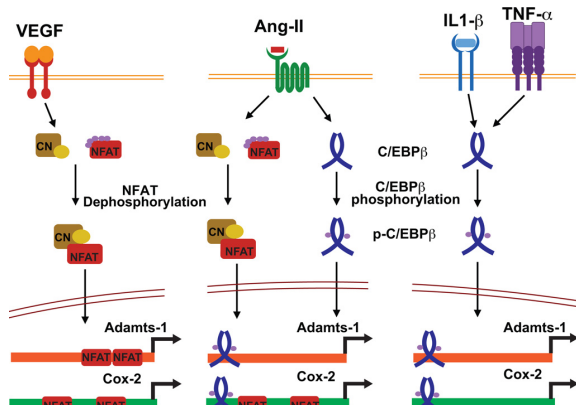


FIG 13 Differential transcriptional activation of the *Adamts-1* and *Cox-2* genes in response to VEGF, Ang-II, TNF- $\alpha$ , and IL-1 $\beta$ . The model shown represents the differential regulation of the *Adamts-1* and *Cox-2* promoters by the NFAT and C/EBP $\beta$  transcription factors during the stimulation of vascular cells by these factors. VEGF-induced upregulation of *Adamts-1* and *Cox-2* gene expression requires activation of the CN/NFAT signal transduction pathway. Although Ang-II also triggers the activation of CN-dependent signaling, *Adamts-1* expression in response to Ang-II is mediated not by this pathway but instead by activation of C/EBP $\beta$  signaling. However, Ang-II-induced upregulation of *Cox-2* requires activation of both the NFAT and C/EBP $\beta$  signaling pathways. Inflammatory stimuli induce *Adamts-1* and *Cox-2* upregulation via a molecular mechanisms that involves activation of C/EBP $\beta$  but not CN signaling.

activation of immune mediators (e.g., members of the TNF superfamily, epidermal growth factor, and Notch signaling pathways) or through a direct action on immune cells. Thus, *Adamts-12* function is associated with neutrophil apoptosis and participates in inflammatory response control (56). Illustrated by atherosclerosis, many inflammatory diseases comprise extracellular matrix remodeling processes that are regulated at different levels by proinflammatory cytokines such as IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  and require metalloproteinase activity. IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  are known to induce *Adamts-1* mRNA in different cell types (57, 58); however, the precise transcriptional mechanism involved awaits identification. Similar to Ang-II, we have identified C/EBP $\beta$  as the chief mediator of *Adamts-1* regulation by IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in vascular cells. C/EBP $\beta$  is also implicated in the induction of *Cox-2* expression by IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ . The convergence of signaling pathways triggered by disparate stimuli such as Ang-II and proinflammatory cytokines in C/EBP $\beta$  activation (Fig. 13) suggests a decisive role for this transcription factor in a broad range of pathophysiological processes. The role of matrix metalloproteinases in diseases that involve remodeling of the vessel wall, such as atherosclerosis, aortic aneurysm, and neointima formation in vascular stenosis, or genetic conditions, including familial aortic diseases, indicates that *Adamts-1* is a promising candidate for the development of novel therapeutic strategies for these disorders. Moreover, the prominent role of C/EBP $\beta$  in the induction of *Adamts-1* by an array of stimuli, including Ang-II, IL-1, and TNF- $\alpha$ , suggests that pharmacological targeting of C/EBP $\beta$  may have utility in the treatment of vascular diseases of different origins.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Y. Ninomiya (Okayama University, Okayama, Japan) and T. Minami (University of Tokyo, Tokyo, Japan) for providing human *ADAMTS1* promoter constructs and the anti-NFATc1 monoclonal antibody, respectively, G. C. Crabtree (Stanford University, Stanford, CA) for providing the Cnb1 conditional knockout mouse, and Rut Alberca for technical assistance.

This work was funded by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (Ministerio de Economía y Competitividad; SAF2012-34296 to J.M.R. and SAF2013-45258-P to M.R.C.), the Fundación La Marató TV3 (264/C/2012 to J.M.R.), the Spanish Ministry of Health (Ministerio de Sanidad y Consumo) Red de Investigación Cardiovascular (RIC) co-funded by FEDER (grants RD06/0042/0022 to J.M.R. and RD12/0042/0023 to A.G.A.), and the Spanish Council for Scientific Research (CSIC; to M.R.C.). The Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III (CNIC) is supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness and the Pro-CNIC Foundation. J.O. is the holder of an FPI fellowship from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (Ministerio de Economía y Competitividad; BES 2010-034552). The cost of this publication has been paid in part by FEDER funds.

We have no competing interests to declare.

REFERENCES

- Daugherty A, Manning MW, Cassis LA. 2000. Angiotensin II promotes atherosclerotic lesions and aneurysms in apolipoprotein E-deficient mice. *J Clin Invest* 105:1605–1612. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI7818>.
- Hellenthal FA, Buurman WA, Wodzig WK, Schurink GW. 2009. Biomarkers of abdominal aortic aneurysm progression. Part 2: inflammation. *Nat Rev Cardiol* 6:543–552. <http://dx.doi.org/10.1038/nrcardio.2009.102>.
- Kaneko H, Anzai T, Takahashi T, Kohno T, Shimoda M, Sasaki A, Shimizu H, Nagai T, Maekawa Y, Yoshimura K, Aoki H, Yoshikawa T, Okada Y, Yozu R, Ogawa S, Fukuda K. 2011. Role of vascular endothelial growth factor-A in development of abdominal aortic aneurysm. *Cardiovasc Res* 91:358–367. <http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvr080>.
- Touyz RM. 2005. Intracellular mechanisms involved in vascular remodeling of resistance arteries in hypertension: role of angiotensin II. *Exp Physiol* 90:449–455. <http://dx.doi.org/10.1113/expphysiol.2005.030080>.
- Kuzuya M, Iguchi A. 2003. Role of matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *J Atheroscler Thromb* 10:275–282. <http://dx.doi.org/10.5551/jat.10.275>.
- Lemarié CA, Tharaux PL, Lehoux S. 2010. Extracellular matrix alterations in hypertensive vascular remodeling. *J Mol Cell Cardiol* 48:433–439. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.09.018>.
- Jönsson-Rylander AC, Nilsson T, Fritsche-Danielson R, Hammarström A, Behrendt M, Andersson JO, Lindgren K, Andersson AK, Wallbrandt P, Rosengren B, Brodin P, Thelin A, Westin A, Hurt-Camejo E, Lee-Sogaard CH. 2005. Role of ADAMTS-1 in atherosclerosis: remodeling of carotid artery, immunohistochemistry, and proteolysis of versican. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:180–185.
- Ren P, Zhang L, Xu G, Palmero LC, Albin PT, Coselli JS, Shen YH, LeMaire SA. 2013. ADAMTS-1 and ADAMTS-4 levels are elevated in thoracic aortic aneurysms and dissections. *Ann Thorac Surg* 95:570–577. <http://dx.doi.org/10.1016/j.athoracsur.2012.10.084>.
- Rodríguez-Manzaneque JC, Fernández-Rodríguez R, Rodríguez-Baena FJ, Iruela-Arispe LM. 2015. ADAMTS proteases in vascular biology. *Matrix Biol* 44–46C:38–45.
- Taketani T, Imai Y, Morota T, Maemura K, Morita H, Hayashi D, Yamazaki T, Nagai R, Takamoto S. 2005. Altered patterns of gene expression specific to thoracic aortic aneurysms: microarray analysis of surgically resected specimens. *Int Heart J* 46:265–277. <http://dx.doi.org/10.1536/ihj.46.265>.
- Porter S, Clark IM, Kevorkian L, Edwards DR. 2005. The ADAMTS metalloproteinases. *Biochem J* 386:15–27. <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20040424>.
- Xu Z, Yu Y, Duh EJ. 2006. Vascular endothelial growth factor upregulates expression of ADAMTS1 in endothelial cells through protein kinase C signaling. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47:4059–4066. <http://dx.doi.org/10.1167/iovs.05-1528>.
- Bongrazio M, Baumann C, Zakrzewicz A, Pries AR, Gaehtgens P. 2000. Evidence for modulation of genes involved in vascular adaptation by pro-

- longed exposure of endothelial cells to shear stress. *Cardiovasc Res* 47: 384–393. [http://dx.doi.org/10.1016/S0008-6363\(00\)00111-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0008-6363(00)00111-5).
14. Dolan J M, Sim FJ, Meng H, Kolega J. 2012. Endothelial cells express a unique transcriptional profile under very high wall shear stress known to induce expansive arterial remodeling. *Am J Physiol Cell Physiol* 302: C1109–C1118. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpcell.00369.2011>.
  15. Muñoz C, Castellanos MC, Alfranca A, Vara A, Esteban MA, Redondo JM, de Landazuri MO. 1996. Transcriptional up-regulation of intracellular adhesion molecule-1 in human endothelial cells by the antioxidant pyrrolidine dithiocarbamate involves the activation of activating protein-1. *J Immunol* 157:3587–3597.
  16. Esteban V, Mendez-Barbero N, Jimenez-Borreguero LJ, Roque M, Novensa L, Garcia-Redondo AB, Salaices M, Vila L, Arbones ML, Campanero MR, Redondo JM. 2011. Regulator of calcineurin 1 mediates pathological vascular wall remodeling. *J Exp Med* 208:2125–2139. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20110503>.
  17. Oblander SA, Zhou Z, Galvez BG, Starcher B, Shannon JM, Durbeej M, Arroyo AG, Tryggvason K, Apte SS. 2005. Distinctive functions of membrane type 1 matrix-metalloprotease (MT1-MMP or MMP-14) in lung and submandibular gland development are independent of its role in pro-MMP-2 activation. *Dev Biol* 277:255–269. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.09.033>.
  18. Hatipoglu OF, Hirohata S, Cilek MZ, Ogawa H, Miyoshi T, Obika M, Demircan K, Shinohata R, Kusachi S, Ninomiya Y. 2009. ADAMTS1 is a unique hypoxic early response gene expressed by endothelial cells. *J Biol Chem* 284:16325–16333. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M109.001313>.
  19. Urso K, Alfranca A, Martínez-Martínez S, Escolano A, Ortega I, Rodríguez A, Redondo JM. 2011. NFATc3 regulates the transcription of genes involved in T-cell activation and angiogenesis. *Blood* 118:795–803. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2010-12-322701>.
  20. Neilson JR, Winslow MM, Hur EM, Crabtree GR. 2004. Calcineurin B1 is essential for positive but not negative selection during thymocyte development. *Immunity* 20:255–266. [http://dx.doi.org/10.1016/S1074-7613\(04\)00052-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1074-7613(04)00052-4).
  21. Escolano A, Martínez-Martínez S, Alfranca A, Urso K, Izquierdo HM, Delgado M, Martín F, Sabio G, Sancho D, Gomez-del Arco P, Redondo JM. 2014. Specific calcineurin targeting in macrophages confers resistance to inflammation via MKP-1 and p38. *EMBO J* 33:1117–1133. <http://dx.doi.org/10.1002/emboj.201386369>.
  22. Rodríguez A, Roy J, Martínez-Martínez S, Lopez-Maderuelo MD, Nino-Moreno P, Ortí L, Pantoja-Uceda D, Pineda-Lucena A, Cyert MS, Redondo JM. 2009. A conserved docking surface on calcineurin mediates interaction with substrates and immunosuppressants. *Mol Cell* 33:616–626. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2009.01.030>.
  23. Armesilla AL, Lorenzo E, Gomez del Arco P, Martínez-Martínez S, Alfranca A, Redondo JM. 1999. Vascular endothelial growth factor activates nuclear factor of activated T cells in human endothelial cells: a role for tissue factor gene expression. *Mol Cell Biol* 19:2032–2043.
  24. Hernández GL, Volpert OV, Iniguez MA, Lorenzo E, Martínez-Martínez S, Grau R, Fresno M, Redondo JM. 2001. Selective inhibition of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis by cyclosporin A: roles of the nuclear factor of activated T cells and cyclooxygenase 2. *J Exp Med* 193:607–620. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.193.5.607>.
  25. Martínez-Martínez S, Redondo JM. 2004. Inhibitors of the calcineurin/NFAT pathway. *Curr Med Chem* 11:997–1007. <http://dx.doi.org/10.2174/0929867043455576>.
  26. Waiser J, Dell K, Bohler T, Dogu E, Gaedeke J, Budde K, Neumayer HH. 2002. Cyclosporine A up-regulates the expression of TGF-beta1 and its receptors type I and type II in rat mesangial cells. *Nephrol Dial Transplant* 17:1568–1577. <http://dx.doi.org/10.1093/ndt/17.9.1568>.
  27. Basu A, Datta D, Zurakowski D, Pal S. 2010. Altered VEGF mRNA stability following treatments with immunosuppressive agents: implications for cancer development. *J Biol Chem* 285:25196–25202. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.119446>.
  28. Martínez-Martínez S, Rodríguez A, Lopez-Maderuelo MD, Ortega-Perez I, Vazquez J, Redondo JM. 2006. Blockade of NFAT activation by the second calcineurin binding site. *J Biol Chem* 281:6227–6235. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M513885200>.
  29. Doyle KM, Russell DL, Sriraman V, Richards JS. 2004. Coordinate transcription of the ADAMTS-1 gene by luteinizing hormone and progesterone receptor. *Mol Endocrinol* 18:2463–2478. <http://dx.doi.org/10.1210/me.2003-0380>.
  30. Tsukada J, Yoshida Y, Kominato Y, Auron PE. 2011. The CCAAT/enhancer (C/EBP) family of basic-leucine zipper (bZIP) transcription factors is a multifaceted highly-regulated system for gene regulation. *Cytokine* 54:6–19. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2010.12.019>.
  31. Minami T, Horiuchi K, Miura M, Abid MR, Takabe W, Noguchi N, Kohro T, Ge X, Aburatani H, Hamakubo T, Kodama T, Aird WC. 2004. Vascular endothelial growth factor- and thrombin-induced termination factor, Down syndrome critical region-1, attenuates endothelial cell proliferation and angiogenesis. *J Biol Chem* 279:50537–50554. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M406454200>.
  32. Suehiro J, Kanki Y, Makihara C, Schadler K, Miura M, Manabe Y, Aburatani H, Kodama T, Minami T. 2014. Genome-wide approaches reveal functional vascular endothelial growth factor (VEGF)-inducible nuclear factor of activated T cells (NFAT) c1 binding to angiogenesis-related genes in the endothelium. *J Biol Chem* 289:29044–29059. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M114.555235>.
  33. Iniguez MA, Martínez-Martínez S, Punzon C, Redondo JM, Fresno M. 2000. An essential role of the nuclear factor of activated T cells in the regulation of the expression of the cyclooxygenase-2 gene in human T lymphocytes. *J Biol Chem* 275:23627–23635. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M001381200>.
  34. Wisniewska MB, Ameyar-Zazoua M, Bakiri L, Kaminska B, Yaniv M, Weitzman JB. 2007. Dimer composition and promoter context contribute to functional cooperation between AP-1 and NFAT. *J Mol Biol* 371: 569–576. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2007.05.079>.
  35. Park HJ, Baek K, Baek JH, Kim HR. 2015. The cooperation of CREB and NFAT is required for PTHrP-induced RANKL expression in mouse osteoblastic cells. *J Cell Physiol* 230:667–679. <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.24790>.
  36. Bandukwala HS, Wu Y, Feuerer M, Chen Y, Barboza B, Ghosh S, Stroud JC, Benoist C, Mathis D, Rao A, Chen L. 2011. Structure of a domain-swapped FOXP3 dimer on DNA and its function in regulatory T cells. *Immunity* 34:479–491. <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2011.02.017>.
  37. Armand AS, Bourajaj M, Martínez-Martínez S, el Azzouzi H, da Costa Martins PA, Hatzis P, Seidler T, Redondo JM, De Windt LJ. 2008. Cooperative synergy between NFAT and MyoD regulates myogenin expression and myogenesis. *J Biol Chem* 283:29004–29010. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M801297200>.
  38. Yang TT, Chow CW. 2003. Transcription cooperation by NFAT.C/EBP composite enhancer complex. *J Biol Chem* 278:15874–15885. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M211560200>.
  39. Macián F, García-Rodríguez C, Rao A. 2000. Gene expression elicited by NFAT in the presence or absence of cooperative recruitment of Fos and Jun. *EMBO J* 19:4783–4795. <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/19.17.4783>.
  40. Martínez GJ, Pereira RM, Aijo T, Kim EY, Marangoni F, Pipkin ME, Togher S, Heissmeyer V, Zhang YC, Crotty S, Lamperti ED, Ansel KM, Mempel TR, Lahdesmaki H, Hogan PG, Rao A. 2015. The transcription factor NFAT promotes exhaustion of activated CD8(+) T cells. *Immunity* 42:265–278. <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2015.01.006>.
  41. Holmes K, Chapman E, See V, Cross MJ. 2010. VEGF stimulates RCAN1.4 expression in endothelial cells via a pathway requiring Ca<sup>2+</sup>/calcineurin and protein kinase C-delta. *PLoS One* 5:e11435. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0011435>.
  42. Yao YG, Duh EJ. 2004. VEGF selectively induces Down syndrome critical region 1 gene expression in endothelial cells: a mechanism for feedback regulation of angiogenesis? *Biochem Biophys Res Commun* 321:648–656. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.06.176>.
  43. Bochkov VN, Mechtcheriakova D, Lucerna M, Huber J, Malli R, Graier WF, Hofer E, Binder BR, Leitinger N. 2002. Oxidized phospholipids stimulate tissue factor expression in human endothelial cells via activation of ERK/EGR-1 and Ca(++)/NFAT. *Blood* 99:199–206. <http://dx.doi.org/10.1182/blood.V99.1.199>.
  44. Mesquita RF, Paul MA, Valmaseda A, Francois A, Jabr R, Anjum S, Marber MS, Budhram-Mahadeo V, Heads RJ. 2014. Protein kinase Cε-calcineurin cosignaling downstream of Toll-like receptor 4 downregulates fibrosis and induces wound healing gene expression in cardiac myofibroblasts. *Mol Cell Biol* 34:574–594. <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.01098-13>.
  45. Villalba M, Kasibhatla S, Genestier L, Mahboubi A, Green DR, Altman A. 1999. Protein kinase Cθeta cooperates with calcineurin to induce Fas ligand expression during activation-induced T cell death. *J Immunol* 163: 5813–5819.
  46. Werlen G, Jacinto E, Xia Y, Karin M. 1998. Calcineurin preferentially

Oller et al.

- synergizes with PKC-theta to activate JNK and IL-2 promoter in T lymphocytes. *EMBO J* 17:3101–3111. <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/17.11.3101>.
47. Ishida A, Murray J, Saito Y, Kanthou C, Benzakour O, Shibuya M, Wijelath ES. 2001. Expression of vascular endothelial growth factor receptors in smooth muscle cells. *J Cell Physiol* 188:359–368. <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.1121>.
48. Lash GE, Innes BA, Drury JA, Robson SC, Quenby S, Bulmer JN. 2012. Localization of angiogenic growth factors and their receptors in the human endometrium throughout the menstrual cycle and in recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 27:183–195. <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/der376>.
49. Tedesco MM, Terashima M, Blankenberg FG, Levashova Z, Spin JM, Backer MV, Backer JM, Sho M, Sho E, McConnell MV, Dalman RL. 2009. Analysis of in situ and ex vivo vascular endothelial growth factor receptor expression during experimental aortic aneurysm progression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29:1452–1457. <http://dx.doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.187757>.
50. Wang H, Keiser JA. 1998. Vascular endothelial growth factor upregulates the expression of matrix metalloproteinases in vascular smooth muscle cells: role of flt-1. *Circ Res* 83:832–840. <http://dx.doi.org/10.1161/01.RES.83.8.832>.
51. Hayashida M, Okazaki K, Fukushi J, Sakamoto A, Iwamoto Y. 2009. CCAAT/enhancer binding protein beta mediates expression of matrix metalloproteinase 13 in human articular chondrocytes in inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* 60:708–716. <http://dx.doi.org/10.1002/art.24332>.
52. Tsushima H, Okazaki K, Hayashida M, Ushijima T, Iwamoto Y. 2012. CCAAT/enhancer binding protein beta regulates expression of matrix metalloproteinase-3 in arthritis. *Ann Rheum Dis* 71:99–107. <http://dx.doi.org/10.1136/annrheumdis-2011-200061>.
53. Nayak A, Glockner-Pagel J, Vaeth M, Schumann JE, Buttman M, Bopp T, Schmitt E, Serfling E, Berberich-Siebel F. 2009. Sumoylation of the transcription factor NFATc1 leads to its subnuclear relocalization and interleukin-2 repression by histone deacetylase. *J Biol Chem* 284:10935–10946. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M900465200>.
54. Terui Y, Saad N, Jia S, McKeon F, Yuan J. 2004. Dual role of sumoylation in the nuclear localization and transcriptional activation of NFAT1. *J Biol Chem* 279:28257–28265. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M403153200>.
55. Zahnow CA. 2009. CCAAT/enhancer-binding protein beta: its role in breast cancer and associations with receptor tyrosine kinases. *Expert Rev Mol Med* 11:e12. <http://dx.doi.org/10.1017/S1462399409001033>.
56. Khokha R, Murthy A, Weiss A. 2013. Metalloproteinases and their natural inhibitors in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 13:649–665. <http://dx.doi.org/10.1038/nri3499>.
57. Cross AK, Haddock G, Stock CJ, Allan S, Surr J, Bunning RA, Buttle DJ, Woodroffe MN. 2006. ADAMTS-1 and -4 are up-regulated following transient middle cerebral artery occlusion in the rat and their expression is modulated by TNF in cultured astrocytes. *Brain Res* 1088:19–30. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2006.02.136>.
58. Ng YH, Zhu H, Pallen CJ, Leung PC, MacCalman CD. 2006. Differential effects of interleukin-1beta and transforming growth factor-beta1 on the expression of the inflammation-associated protein, ADAMTS-1, in human decidual stromal cells in vitro. *Hum Reprod* 21:1990–1999. <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/del108>.



