



UNIVERSIDAD AUTONOMA
DE MADRID

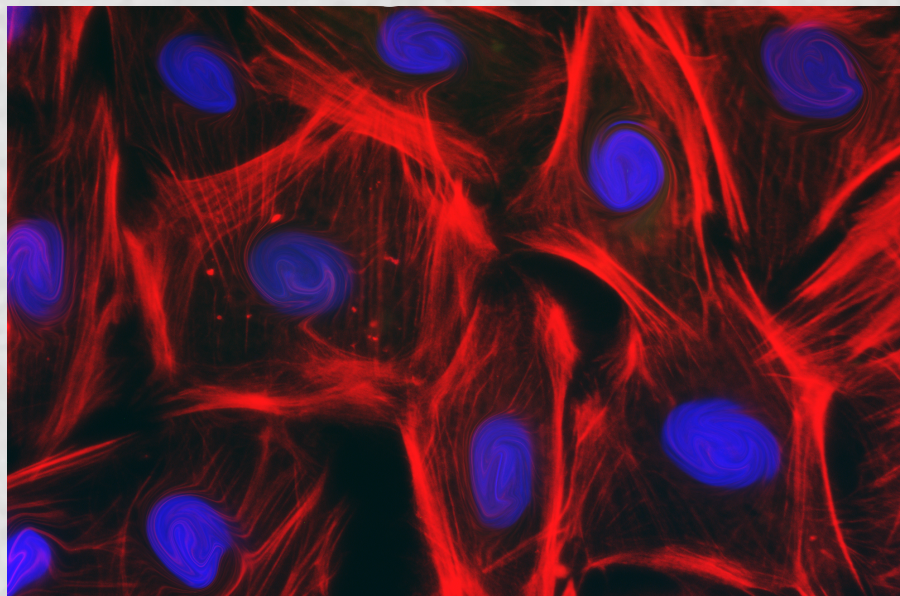
Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Molecular

TESIS DOCTORAL

REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA POR LA
PROSTAGLANDINA $F_{2\alpha}$ EN LINFOCITOS T Y CARDIOMIOCITOS:
ACTIVACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE
CALCIO/CALCINEURINA/NFAT



ELENA HERNÁNDEZ SUBIRÁ

Madrid, Mayo de 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR



REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA POR LA PROSTAGLANDINA $F_{2\alpha}$
EN LINFOCITOS T Y CARDIOMIOCITOS:
ACTIVACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE CALCIO/CALCINEURINA/NFAT

Memoria presentada para optar al grado de Doctora en Biociencias Moleculares por:

Elena Hernández Subirá

Director de tesis:

Miguel Ángel Íñiguez Peña

Madrid, Abril 2014



Departamento de Biología Molecular

D. Miguel Ángel Íñiguez Peña, Profesor Titular del Departamento de Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid,

CERTIFICA

Que **Dña. Elena Hernández Subirá**, Licenciada en Bioquímica por la Universidad Autónoma de Madrid, y Máster en Biomedicina Molecular por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral que lleva por título: ***REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA POR LA PROSTAGLANDINA F_{2α} EN LINFOCITOS T Y CARDIOMIOCITOS: ACTIVACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE CALCIO/CALCINEURINA/NFAT.***

Revisado el presente trabajo, expreso mi 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 28 de Marzo de 2014

Dr. Miguel Ángel Íñiguez

Profesor titular de la UAM

Elena Hernández Subirá ha disfrutado de una beca del Programa JAE Predoc convocatoria 2008 del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Este trabajo de Tesis ha sido financiado por las ayudas a los proyectos “Regulación de la expresión de genes responsables de la producción de prostaglandinas y análisis de su función en cardiomiocitos y macrófagos. Implicaciones en la fisiopatología cardiovascular” (BFU2007-62659/BMC), “Mediadores inflamatorios lipídicos en la fisiopatología cardiovascular” (BFU2010-21055) y “Acciones de prostanoides y ligandos del receptor LXR en procesos inflamatorios y sus implicaciones en la fisiopatología cardiovascular” (SAF2011-23971) otorgadas por el MEC, MICINN y MINECO respectivamente y por una ayuda complementaria de la CAM-UAM (CCG08-UAM/BIO-4299)

A mis padres,
a mi familia.

*“Nunca consideres el estudio como una obligación,
sino como una oportunidad para penetrar en el bello y
maravilloso mundo del saber”*

Albert Einstein

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
ABSTRACT/RESUMEN	7
INTRODUCCIÓN	
1. Biosíntesis de prostanoides	13
1.1. Ciclooxygenasas	13
1.2. Sintetas de Prostanoides	15
1.3. Receptores de Prostanoides	16
2. La Prostaglandina F_{2α}	19
2.1. Señalización de PGF _{2α} a través del receptor FP	20
2.2. Acciones de PGF _{2α} sobre la activación de factores de transcripción	21
3. Prostanoides y Linfocitos T	22
3.1. Activación de linfocitos T	22
3.2. Factores de transcripción en la activación de linfocitos T	23
3.2.1. El factor de transcripción NFκB	23
3.2.2. El factor de transcripción AP-1	23
3.2.3. El factor de transcripción NFAT	24
3.3. Acciones y relevancia de prostanoides en linfocitos T	26
4. Prostanoides en la fisiopatología cardiaca	28
4.1. Hipertrofia cardiaca	29
4.2. GPCRs y señalización intracelular en hipertrofia cardiaca	31
4.2.1. GPCRs y activación de MAPKs	32
4.2.2. GPCRs y activación de Calcineurina/NFAT	32
4.3. Genes marcadores de hipertrofia cardiaca	33
4.4. Prostanoides en hipertrofia cardiaca	34

OBJETIVOS	39
MATERIALES Y MÉTODOS	
1. Materiales	43
1.1. Líneas celulares	43
1.2. Cultivos primarios	43
1.3. Reactivos	44
1.4. Anticuerpos	45
1.5. Sondas para RT-PCR cuantitativa	45
1.6. Sondas para RT-PCR convencional	46
1.7. Plásmidos	46
1.7.1. Plásmidos indicadores (luciferasa)	46
1.7.2. Plásmidos de expresión	47
2. Métodos	48
2.1. Transfección estable	48
2.2. Transfección transitoria	48
2.3. Actividad luciferasa	50
2.4. Obtención y análisis del ARN	50
2.5. Obtención y análisis de proteínas	51
2.6. Inmunofluorescencia	52
2.7. Medida de la movilización de calcio	52
2.8. Medida de prostaglandinas: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)	53
2.9. Análisis estadístico	53

RESULTADOS

1. Acciones de la prostaglandina $F_{2\alpha}$ en linfocitos T	57
1.1. Movilización de calcio en respuesta a $PGF_{2\alpha}$	57
1.2. Activación del factor de transcripción NFAT por agonistas del receptor FP	58
1.2.1. Translocación de NFAT al núcleo	58
1.2.2. Regulación de la actividad transcripcional mediada por NFAT	59
1.2.3. Participación de $G\alpha_q$ en la activación transcripcional dependiente de NFAT a través del receptor FP	63
1.3. Activación de la transcripción de genes dependientes de NFAT por agonistas del receptor FP	65
2. Acciones de la prostaglandina $F_{2\alpha}$ en cardiomiocitos	67
2.1. Inducción de hipertrofia en cardiomiocitos	67
2.2. Activación de MAP quinasas por agonistas del receptor FP	69
2.3. Movilización de calcio por $PGF_{2\alpha}$ en cardiomiocitos	70
2.4. Activación del factor de transcripción NFAT en células cardiacas	71
2.4.1. Efecto de los agonistas del receptor FP sobre la defosforilación y translocación al núcleo de NFAT	71
2.4.2. Regulación de la activación transcripcional dependiente de NFAT por agonistas del receptor FP en cardiomiocitos primarios y en células H9c2	77
2.4.2.1. <i>Análisis de la activación transcripcional de NFAT a través de diferentes receptores de prostanoides</i>	80
2.4.2.2. <i>Dependencia de la interacción del receptor FP con la proteína $G\alpha_q$ en la activación de NFAT por $PGF_{2\alpha}$</i>	81

2.5. Regulación de la expresión génica por $\text{PGF}_{2\alpha}$ en células cardiacas	82
2.5.1. Efectos de $\text{PGF}_{2\alpha}$ sobre la expresión de COX-2 en células cardiacas	82
2.5.1.1. <i>Inducción de la expresión de COX-2 mediada por NFAT</i>	82
2.5.1.2. <i>Efectos de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ sobre el promotor de COX-2</i>	85
2.5.2. Efectos de $\text{PGF}_{2\alpha}$ sobre la expresión de RCAN-1 en células cardiacas	87
2.5.2.1. <i>Inducción de la expresión de RCAN-1 en células cardiacas</i>	87
2.5.2.2. <i>Efectos de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ sobre el promotor de RCAN-1</i>	88
2.5.3. Regulación de la expresión de genes marcadores de hipertrofia cardiaca (β -MHC, ANP y BNP) por $\text{PGF}_{2\alpha}$	90
DISCUSIÓN	
1. Activación de la vía de señalización de Ca^{2+}/Calcineurina/NFAT por $\text{PGF}_{2\alpha}$	97
2. Relevancia de las acciones de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ en linfocitos T	99
3. Relevancia de las acciones de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ en cardiomiocitos	100
CONCLUSIONES	109
BIBLIOGRAFÍA	113

ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidónico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AINEs	Anti-inflamatorios no esteroideos
AMPC	Adenosín monofosfato cíclico
Ang II	Angiotensina II
ANP	Péptido natriurético auricular
AP1	Proteína Activadora 1
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BNP	Péptido natriurético tipo B
BSA	Albúmina de suero bovino
Ca ²⁺	Calcio
CaM	Calmodulina
cDNA	ADN copia
CK1	Caseína quinasa 1
CnA	Calcineurina
CNP	Péptido natriurético tipo C
COX-1	Ciclooxigenasa-1
COX-2	Ciclooxigenasa-2
CRTH2 (DP2)	Receptor quimiotáctico de PGD ₂ expresado en células Th2
CsA	Ciclosporina A
DAG	Diacilglicerol
DBD	Dominio de unión a ADN
DMEM	Medio basal de Eagle modificado por Dulbecco
DP1	Receptor de PGD ₂
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EP	Receptor de PGE ₂
FCS	Suero de ternera fetal
FP	Receptor de PGF _{2α}
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
GPCR	Receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas

GSK3 β	Quinasa 3 β de la glucógeno sintasa
h	hora
HBSS	Solución equilibrada en sales de Hank
HS	Suero de caballo
IL-	Interleuquina
Io	Ionóforo de calcio A23187
Iom	Ionomicina
IP	Receptor de PGI ₂
IP3	Inositol 1, 4, 5 trifosfato
JNK	Quinasa c-Jun N-terminal
MAPKs	Proteína quinasa activada por mitógenos
MEF2	Factor potenciador de miocitos-2
β -MHC	Cadena pesada de la miosina- β
min	minutos
Myh7	Gen de la cadena pesada de la miosina- β
NFAT	Factor nuclear de células T activadas
NHR	Región homóloga para NFAT
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PG	Prostaglandina
PGFS	Prostaglandina F Sintasa
PGI ₂	Prostaciclina
PI3K	Fosfatidil Inositol-3 quinasa
PIP2	Fosfatidilinositol 4, 5 bifosfato
PIP3	Fosfatidilinositol 3, 4, 5 trifosfato
PKA	Proteína quinasa A
PKC	Proteína quinasa C
PLA ₂	Fosfolipasa A2
PLC	Fosfolipasa C
RCAN1	Regulador de calcineurina 1
RLU	Unidad relativa de luz
RPMI	Medio <i>Roswell Park Memorial Institute</i>

RT	Transcripción reversa
RTyrK	Receptores con actividad tirosina quinasa
SD	Desviación estándar
SDS	Dodecil sulfato sódico
SkA	α -actina esquelética
STAT	Factor transductor de señales y activador de la transcripción
TAC	Constricción transversa de la aorta
TCR	Receptor de células T
TP	Receptor de TXA ₂
TPA	Éster de forbol 12-miristato 13-acetato
TX	Tromboxano
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular

ABSTRACT/RESUMEN

Prostanoids, including prostaglandins (PGs) and thromboxanes (TXs), are originated from arachidonic acid after the sequential action of cyclooxygenases (COX-1 and COX-2) and different PG and TX terminal synthases. These lipid mediators are involved in a wide variety of biological processes including inflammatory response and cardiovascular pathophysiology. It is known that prostanoids as PGE₂ are able to modulate the immune response. However, the potential role of other prostaglandins such as PGF_{2α} in T lymphocytes is not known in detail. The results presented in the first part of this work show that PGF_{2α}, as well as FP agonists, after binding to the FP receptor, are able to induce the expression of genes in T cells, as IL-2 or COX-2. Our results show that PGF_{2α} promotes Ca²⁺ mobilization and activation of the Nuclear Factor of Activated T cells (NFAT), which plays an essential role in the regulation of the transcription of these genes. These studies describe the involvement of a Gαq protein coupled to the FP receptor in the induction of the expression of NFAT-dependent genes in T cells.

In the second part, we show the involvement of PGF_{2α} in the process of cardiac hypertrophy, analyzing its effects on gene expression in cardiac cells. Our results confirm the ability of this prostaglandin to induce hypertrophy in cultured cardiomyocytes and reveal the involvement of the FP receptor coupled to a Gαq protein in this process. As in T lymphocytes, PGF_{2α} is also able to promote Ca²⁺ mobilization and activation of NFAT in cardiomyocytes in culture. This results in the induction of NFAT-dependent genes with a key role in cardiovascular disease such as COX-2; in the regulation of NFAT activation as RCAN-1; as well as genes considered cardiac hypertrophy markers like ANP (Atrial Natriuretic Peptide) or β-MHC (β-Myosin Heavy Chain).

Together, these results provide new evidence about the actions of FP receptor agonists, providing new data on their effects on the regulation of gene expression through activation of the Ca²⁺ / calcineurin / NFAT signaling pathway. The ability of PGF_{2α} and FP agonists to regulate NFAT-dependent gene transcription in T cells and in cardiac cells, highlight the potential role of these agents in the immune response and in cardiovascular pathophysiology.

Los prostanoides, entre los que se incluyen las prostaglandinas (PGs) y tromboxanos (TXs), se originan a partir de ácido araquidónico tras la acción secuencial de las ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2) y diferentes PG y TX sintasas terminales. Estos mediadores lipídicos están involucrados en múltiples procesos biológicos, incluyendo la respuesta inflamatoria y la fisiopatología cardiovascular. Es sabido que prostanoides como la PGE₂, son capaces de modular la respuesta inmune. Sin embargo, no se conoce en detalle el papel potencial de otras prostaglandinas tales como la PGF_{2α}, en los linfocitos T. Los resultados presentados en la primera parte de este trabajo muestran que la PGF_{2α}, así como agonistas FP, son capaces de inducir la expresión de genes como la interlequina (IL)-2 o COX-2 en las células T, tras su unión al receptor FP. Nuestros resultados muestran que la PGF_{2α} promueve la movilización de Ca²⁺ y la activación del factor nuclear de células T activadas (NFAT), que desempeña un papel esencial en la regulación de la transcripción de estos genes. Estos estudios describen la participación de una proteína Gαq acoplada al receptor FP, en la inducción de la expresión de genes dependientes de NFAT en células T.

En una segunda parte se muestra la participación de PGF_{2α} en el proceso de hipertrofia cardíaca y el análisis de sus efectos sobre la expresión génica en las células cardíacas. Nuestros resultados confirman la capacidad de esta prostaglandina para inducir hipertrofia en cardiomiocitos cultivados y ponen de manifiesto la implicación del receptor FP acoplado a una proteína Gαq en este proceso. Al igual que en los linfocitos T, la PGF_{2α} es capaz de promover la movilización de Ca²⁺ y la activación de NFAT en cardiomiocitos en cultivo, lo que tiene como resultado la inducción de genes dependientes de NFAT con un papel clave en la enfermedad cardiovascular tales como la COX-2; en la regulación de la activación de NFAT como RCAN-1; así como de genes considerados marcadores de hipertrofia cardíaca como ANP (péptido natriurético auricular) o β-MHC (β-miosina de cadena pesada).

En conjunto, estos resultados aportan nuevas evidencias sobre la acción de los agonistas del receptor FP, proporcionando nuevos datos sobre sus efectos en la regulación de la expresión génica a través de la activación de la vía de señalización de Ca²⁺ / calcineurina / NFAT. La capacidad de PGF_{2α} y los agonistas del receptor FP para regular la transcripción de genes dependientes de NFAT en células T y en células cardíacas, ponen de relieve la función potencial de estos agentes en la respuesta inmune y en la fisiopatología cardiovascular.

INTRODUCCIÓN

1. Biosíntesis de prostanoïdes

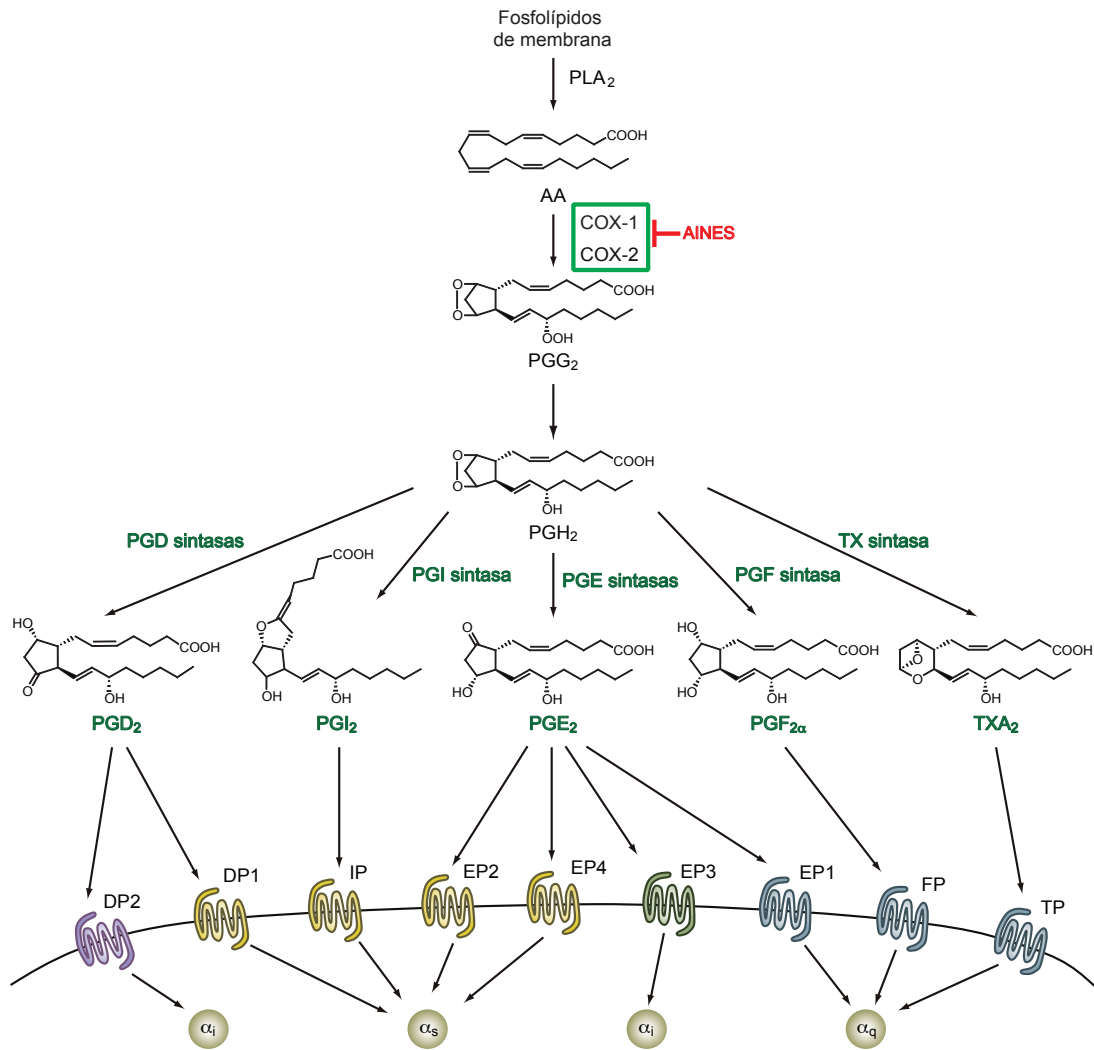
Los prostanoïdes, los cuales incluyen a prostaglandinas (PGs) y tromboxanos (TXs), son un grupo de moléculas originadas por la oxigenación de ácidos grasos esenciales de 20 carbonos (Bos et al, 2004). Son importantes mediadores lipídicos que participan en numerosos procesos fisiológicos, tales como el mantenimiento de la función renal, la homeostasis vascular, la maduración de los cuerpos lúteos o la segregación de neurotransmisores, además de realizar acciones esenciales en procesos inflamatorios (Funk, 2001).

La biosíntesis de prostanoïdes comienza con la liberación del ácido araquidónico (AA) a partir de fosfolípidos de membrana por acción de la fosfolipasa A₂ (PLA₂), tras lo cual, el AA es convertido en PGH₂ mediante las enzimas Prostaglandina H₂ endoperóxido sintasas (PGHS), también denominadas ciclooxigenasas (COXs) (Kudo y Murakami, 2003). Estas enzimas tienen dos actividades enzimáticas, una actividad ciclo-oxigenasa que cicla el AA y forma el endoperóxido cíclico PGG₂, y una actividad peroxidasa que transforma la PGG₂ en el intermediario inestable PGH₂. Sobre este sustrato actúan PG y TX sintasas específicas que dan lugar a los diferentes productos finales biológicamente activos como las prostaglandinas (PGD₂, PGE₂, PGF_{2α}), prostaciclina (PGI₂) y tromboxanos (TXA₂) (Aid & Bosetti, 2011; Hirata & Narumiya, 2012; Rocca & FitzGerald, 2002) (Figura I1).

1.1. Ciclooxigenasas

Existen dos isoformas de COX, denominadas COX-1 y COX-2. Aunque ambas son muy similares en cuanto a estructura y mecanismo de acción, difieren en varios aspectos funcionales. Mientras que COX-1 se localiza a nivel del retículo endoplásmico, COX-2 actúa preferentemente en la envoltura nuclear (Morita et al, 1995). COX-1 se expresa constitutivamente en la mayoría de los tejidos, de modo que su concentración permanece relativamente estable, aunque se han descrito pequeños cambios en su expresión tras la estimulación con hormonas o factores de crecimiento (Rocca & FitzGerald, 2002). Se considera que COX-1 actúa principalmente regulando funciones fisiológicas tales como la agregación plaquetaria, la protección de la mucosa gástrica o la función renal (Bos et al, 2004; Rocca & FitzGerald, 2002). La expresión de COX-2, sin embargo, se induce tras el tratamiento con diversos mediadores inflamatorios, citoquinas, endotoxinas, factores de crecimiento o mitógenos en numerosos tipos celulares, por lo que se considera que la producción de PGs dependiente de COX-2 juega un papel importante en procesos inflamatorios y de proliferación celular (Rocca & FitzGerald, 2002; Smith & Langenbach, 2001).

La regulación de la expresión de COX-2 ocurre esencialmente a nivel transcripcional, habiéndose descrito diferentes vías de señalización y factores de transcripción implicados en la regulación de la transcripción de COX-2, dependiendo del estímulo y del tipo celular. Factores de transcripción como NFκB (*nuclear factor kappa B*), CREBP (*cAMP response element-binding protein*), NFIL6(C/EBPb), AP-1 (*Activator protein-1*), IRFs (*Interferon*



Modificado de Hirata & Narumiya, 2012

Figura I1: Metabolismo del ácido araquidónico. Los prostanoides PGD₂, PGI₂, PGE₂, PGF_{2α} y TXA₂ se forman a partir del ácido araquidónico (AA) por acción de las enzimas ciclooxygenasas (COX-1, COX-2) y de distintas PG y TX sintasas específicas. Los prostanoides señalizan a través de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs). Se muestra el tipo de proteína Gα a la que se acopla cada receptor de forma predominante.

regulatory factors) o NFAT (*Nuclear factor of activated T cells*) participan en la inducción de la transcripción de COX-2 en diferentes tipos celulares (Blanco et al, 2000; Iniguez et al, 2000; Tanabe & Tohnai, 2002). La inducción transcripcional de COX-2 se ve inhibida por drogas anti-inflamatorias o inmunosupresivas como los glucocorticoides o la ciclosporina A (Iniguez et al, 1999; Kujubu & Herschman, 1992), así como con citoquinas anti-inflamatorias como IL-4, IL-10 e IL-13 (Diaz-Cazorla et al, 1999; Niiro et al, 1997).

Las ciclooxygenasas son dianas de los fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs), los cuales inhiben su actividad enzimática, y por tanto la producción de prostanoideos. De acuerdo con su selectividad en la inhibición de ambas isoformas de COX, estas drogas pueden dividirse en AINEs clásicos, como la aspirina o el ibuprofeno, que inhiben ambas isoformas a dosis normales; o AINEs selectivos para COX-2, también llamados “coxibs” (Celecoxib, Rofecoxib, Etoricoxib, Valdecoxib y Lumiracoxib). Estos últimos fueron desarrollados con la idea de obtener nuevos AINEs más seguros con una toxicidad gastrointestinal y renal reducidas, toxicidad derivada en principio de la inhibición de la COX-1, como en el caso de los AINEs clásicos. Sin embargo, aunque estas drogas han resultado ser potentes anti-inflamatorios con menor daño gástrico que los inhibidores no selectivos, todavía se asocia su uso con efectos secundarios de daño gastrointestinal y renal (Coruzzi et al, 2007; Rostom et al, 2007; Warner et al, 1999). Una preocupación adicional ha surgido por el hecho de que algunos coxibs incrementan el riesgo de padecer problemas cardiovasculares graves como el infarto de miocardio o el derrame cerebral (Caldwell et al, 2006; Fosslie, 2005; Ray et al, 2002). Esto llevó a la retirada del mercado de algunos de estos coxibs como el Rofecoxib y el Valdecoxib, y ha planteado serias dudas sobre la seguridad cardiovascular de los AINEs (Kearney et al, 2006; Martinez-Gonzalez & Badimon, 2007; McGettigan & Henry, 2006). Por otro lado, estas observaciones han estimulado el estudio sobre el conocimiento acerca de las acciones de las COXs y de los prostanoideos en la fisiopatología cardiovascular.

1.2. Sintetas de prostanoideos

Las acciones diferenciales de COX-1 o COX-2 no sólo se deben a los diferentes niveles de expresión de éstas según el tipo celular, sino también a la acción coordinada de sintetas de prostanoideos que convierten el intermediario PGH_2 en las distintas clases de PGs y TXs (Iniguez et al, 2008; Ricciotti & FitzGerald, 2011; Rocca & FitzGerald, 2002) (Figura I1).

Se han descrito tres tipos de PGE sintasa (PGES) que participan en la síntesis de PGE_2 : una citosólica (cPGES) y dos asociadas a membrana (mPGES-1 y mPGES-2). La cPGES, de expresión constitutiva, se acopla funcionalmente preferentemente con la COX-1, por lo que se considera involucrada en la producción fisiológica de PGE_2 (Murakami et al, 2002). Por su parte, la mPGES-1, de expresión inducible, se acopla funcionalmente con COX-2, y su inducción suele darse de manera coordinada con la de esta enzima (Samuelsson et al, 2007). Por otro lado, la mPGES-2 puede acoplarse tanto a COX-1 como a COX-2, aunque se plantean dudas acerca de su relevancia en la producción de PGE_2 *in*

vivo (Hara et al, 2010).

La síntesis de PGI_2 y TXA_2 tiene lugar tras la acción de sus respectivas sintasas: la PGI_2 sintasa (PGIS) (Hara et al., 1994) y la TXA_2 sintasa (TXAS) (Shen & Tai, 1998). La expresión coordinada de COX-1 y TXAS en plaquetas (Smith et al, 2000) y de la COX-2 y PGIS en células endoteliales y células del músculo liso vascular, determinan la producción de TXA_2 y de PGI_2 en estos tipos celulares. (McAdam et al, 1999). Dado que el TXA_2 y la PGI_2 tienen funciones biológicas opuestas, vasoconstrictor y protombótico el primero y vasodilatadora y antitrombótica la segunda, el balance entre estos dos mediadores es esencial tanto para la homeostasis vascular como para el desarrollo de enfermedades de etiología vascular (Dogne et al, 2005; Flavahan, 2007; Ricciotti & FitzGerald, 2011).

Se han descrito dos enzimas implicadas en la producción de PGD_2 a partir de PGH_2 , denominadas PGD sintasa tipo lipocalina (L-PGDS) y PGD sintasa hematopoyética (H-PGDS). La L-PGDS está involucrada en la producción y regulación de PGD_2 en el sistema nervioso central, mientras que la H-PGDS es responsable de la producción de PGD_2 en mastocitos (Kanaoka & Urade, 2003; Urade & Hayaishi, 2000). Funcionalmente, ambas se han asociado a la actividad de COX-2. Por su parte, a través de una serie de pasos no enzimáticos, a partir de la PGD_2 se pueden originar derivados prostanoideos de la serie J con propiedades anti-inflamatorias como las ciclopentenonas PGJ_2 , $\Delta^{12}\text{PGJ}_2$ y 15deoxi- $\Delta^{12,14}\text{PGJ}_2$ (15d- PGJ_2) (Helliwell et al, 2004).

La $\text{PGF}_{2\alpha}$ puede ser sintetizada a partir de PGH_2 por la acción de la PGH 9-11-endoperóxido reductasa o PGF sintasa (PGFS), aunque también puede generarse a partir de PGE_2 o de PGD_2 por la acción de PGE cetoreductasas (Watanabe, 2002). La asociación con COX-1 da cuenta de la mayor parte de la producción de $\text{PGF}_{2\alpha}$ en útero (Gross et al, 1998), aunque bajo determinadas condiciones patológicas en las que se induce COX-2, esta isoforma también puede ser responsable de la producción de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Gross et al, 2000; Smith & Langenbach, 2001).

De tal forma, la producción relativa de cada uno de los diferentes prostanoideos en un tipo celular determinado, dependerá tanto de los niveles de expresión de COXs como de la presencia de una u otra PG o TX sintasa (Helliwell et al, 2004).

1.3. Receptores de Prostanoides

Los prostanoideos ejercen sus efectos a través de la unión a receptores en la superficie celular, pertenecientes a la familia de receptores de siete dominios transmembrana acoplados a proteínas G (GPCRs). La unión del ligando a este tipo de receptores provoca un cambio conformacional en el receptor que promueve su acción como factor de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF; *Guanine nucleotide exchange factor*), lo que lleva a la activación de una proteína G asociada, mediante la disociación de GDP y la unión de GTP en la subunidad α de la proteína G. Esta subunidad junto con el GTP unido, puede entonces disociarse de las subunidades $\beta\gamma$. Tanto las subunidades $\beta\gamma$ como las α tienen capacidad para activar distintos efectores que, en el caso de la subunidad α , serán diferentes según el

subtipo de $G\alpha$ presente. La hidrólisis del GTP a GDP, un proceso regulado por las proteínas RGS (*Regulator of G-protein signaling*), causa la reasociación del heterotrímero y el cierre del ciclo de activación (Tuteja, 2009). Además de esta vía clásica de activación, se ha visto que los GPCRs también pueden señalar sin que ocurra una disociación del complejo heterotrimérico de proteínas G (Klein et al, 2000) (Figura I2). La señalización a través de GPCRs se termina, además de por la acción de las proteínas RGS sobre la proteína $G\alpha$, mediante proteínas quinasa que específicamente reconocen y fosforilan los GPCRs (GRKs; G Protein-coupled Receptor Kinases). La fosforilación del receptor mediada por GRKs provoca la unión de proteínas citosólicas denominadas β -arrestinas que, además de impedir la interacción de los GPCRs con las proteínas G, funcionan como adaptadores que permiten el reclutamiento de la maquinaria de endocitosis (Ribas et al, 2007).

A pesar del tamaño y la diversidad de la familia de GPCRs, el número de proteínas G existentes para iniciar las distintas cascadas de señalización intracelulares es relativamente pequeño. La clasificación de las proteínas G se basa en los tipos de subunidad $G\alpha$ existentes. En este sentido se han descrito 5 familias de proteínas $G\alpha$: Gas, Gai/o, G α q/11, G α 12/13 (Tilley, 2011) y la recientemente descubierta Gv (Oka et al, 2009). Aunque los GPCRs son capaces de activar a más de un subtipo de proteína $G\alpha$, normalmente muestran una preferencia por un subtipo u otro. Esta selectividad del receptor por una proteína $G\alpha$ determinada se debe a la conformación que adopta el receptor en su dominio GEF cuando tiene unido el ligando, aunque dicha selectividad puede variar dependiendo de la disponibilidad del subtipo de proteína $G\alpha$ o de la fosforilación del receptor (Gudermann et al, 1997).

Los receptores de prostanoideos se han clasificado en cinco tipos básicos dependiendo de su especificidad por los cinco tipos principales de prostanoideos (PGE_2 , PGI_2 , TXA_2 , PGD_2 y $PGF_{2\alpha}$), denominados EP, IP, TP, DP y FP, respectivamente (Rocca & FitzGerald, 2002) (Figura I1). Existen cuatro subtipos de receptor para PGE_2 denominados EP1, EP2, EP3 y EP4. Para la PGD_2 se han descrito dos tipos de receptores, denominados DP1 y CRTH2 (o DP2) (Hirata & Narumiya, 2012; Narumiya & FitzGerald, 2001). Mediante estudios con ratones deficientes en los diferentes receptores, se han podido determinar las funciones que cada prostanoide media al actuar a través de su receptor, así como las rutas de señalización que son activadas. La señalización a través de los receptores considerados “relajantes”, EP2, EP4, IP y DP1, acoplados a una proteína $G\alpha_s$ estimula la producción de AMPc (adenosín monofosfato cíclico). Por otra parte, los receptores TP, FP y EP1, acoplados a una proteína $G\alpha_q$, inducen la movilización de calcio y forman parte de los receptores denominados “contráctiles”. Los receptores EP3 son clasificados como “inhibidores” al mediar la disminución de la producción de AMPc, estando acoplados a proteínas $G\alpha_i$ (Alfranca et al, 2006; Hirata & Narumiya, 2012; Matsuoka & Narumiya, 2007). Por último, el receptor CRTH2 para la PGD_2 se acopla con proteínas $G\alpha_i$ capaces de desencadenar tanto una bajada de los niveles de AMPc como la movilización de calcio intracelular (Sawyer et al, 2002). Además, tanto PGD_2 como su metabolito 15d-PGJ₂ son capaces de unirse y activar los receptores nucleares PPAR γ (*Peroxisome Proliferator*

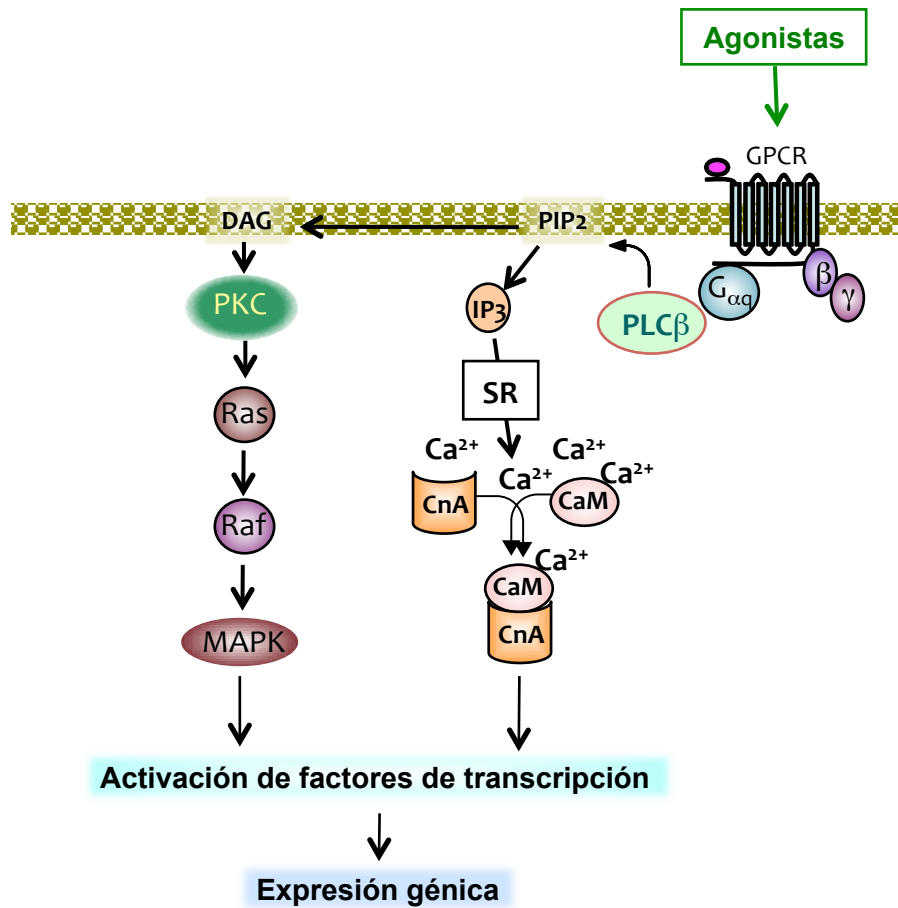


Figura I2: Principales rutas de señalización tras la activación de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) de tipo Gαq. El principal efector de las proteínas Gαq es la PLC-β (fosfolipasa C-β), que hidroliza el fosfatidilinositol 4, 5 bifosfato (PIP2) en inositol 1, 4, 5-trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). El IP3 media la liberación de Ca²⁺ del retículo sarcoplásmico (SR). El Ca²⁺ se une a la proteína calmodulina (CaM) que es capaz de activar entonces a la fosfatasa calcineurina (CnA). El DAG por su parte promueve la activación de PKC, que conduce a su vez a la activación de la ruta de las MAPKs. Estas rutas convergen en la activación de diferentes factores de transcripción responsables de la expresión génica.

Activated Receptor) (Na & Surh, 2003).

Los diferentes prostanoideos pueden unirse a otros receptores además del específico con distinta afinidad. Así, mientras que los EPs y el FP unen preferentemente PGE_2 y $PGF_{2\alpha}$ respectivamente, aunque con menor afinidad, la PGE_2 también puede unirse al FP, de la misma forma que la $PGF_{2\alpha}$ puede unirse a EP1 y EP3 con cierta afinidad (Breyer et al, 2001; Woodward et al, 2011). A su vez, los receptores de prostanoideos pueden acoplarse a más un tipo de proteína G, de tal forma que: el receptor EP4 puede señalizar a través de Gai además de por Gas; el receptor IP puede acoplarse a Gαq, Gai o Gas; el receptor FP, además de Gαq puede acoplarse a Gα12/13 o Gai; y el receptor TP es capaz de señalizar a través de Gas, Gai, Gα12/13 y Gα15/16 (Hirata & Narumiya, 2012).

El acoplamiento preferencial de cada receptor de prostanoide a una proteína G específica con la consiguiente activación de una determinada ruta de transducción de señales, genera un nivel adicional de regulación para la actividad biológica de estas moléculas. Esto es especialmente importante para aquellos prostanoideos que pueden unirse a varios receptores o a varias isoformas de esos receptores y que son, por lo tanto, capaces de activar distintas proteínas G y distintas rutas de señalización. La expresión diferencial de estos receptores en los distintos tipos celulares, o la modulación de su expresión en un tipo celular concreto, puede dar lugar a una amplia gama de respuestas biológicas a un único prostanoide (Alfranca et al, 2006).

2. La prostaglandina $F_{2\alpha}$

La $PGF_{2\alpha}$ es producida principalmente por la acción reductora de la enzima PG endoperoxidoreductasa (PGFS) sobre el precursor PGH_2 , aunque también puede sintetizarse a partir de otras prostaglandinas como la PGE_2 por acción de la PGE_2 9-cetorreductasa. Además, la PGFS puede sintetizar $PGF_{2\alpha}$ a partir de PGD_2 mediante su actividad PGD_2 -11-ketorreductasa (Komoto et al, 2006). Se ha identificado una enzima más que podría ser responsable de la producción de $PGF_{2\alpha}$ en endometrio, llamada 20α-hidroxiesteroide deshidrogenasa (20α-HSD) (Madore et al, 2003).

La $PGF_{2\alpha}$ participa en diferentes procesos fisiológicos como en la función reproductora femenina (ovulación, cambios cíclicos del endometrio, implantación, luteólisis, contracción uterina e inducción del parto) (Basu, 2010), el mantenimiento de la función renal (Gilbert et al, 2011) y el mantenimiento de la presión intraocular (Lee & McCluskey, 2010). Además, debido a su capacidad vaso- y bronco-constrictora por sus efectos en la contracción del músculo liso, la $PGF_{2\alpha}$ también se encuentra involucrada en la patología cardiovascular (Basu, 2007). Esta PG también se ha asociado con el crecimiento celular hipertrófico y la inducción de la síntesis de interleuquinas (Bos et al, 2004).

2.1. Señalización de $\text{PGF}_{2\alpha}$ a través del receptor FP

Como se mencionó anteriormente, los receptores de prostanoïdes pertenecen a la familia de GPCRs. La $\text{PGF}_{2\alpha}$ señala preferentemente a través de su unión al receptor FP, aunque también puede unirse con una afinidad significativa a los receptores EP1 y EP3. Se han descrito dos isoformas del receptor, FP_A y FP_B , que se generan por procesamiento alternativo del ARNm y que difieren en la región carboxilo-terminal (Alfranca et al, 2006). Ambas isoformas comparten características funcionales, aunque se han descrito situaciones en las que difieren, como por ejemplo en el proceso de translocación nuclear de β -catenina que provoca un incremento en la transcripción mediada por Tcf/Lef, en el que participa la isoforma FP_B pero no la FP_A (Fujino & Regan, 2001).

Ambas isoformas del receptor FP se unen preferentemente a una proteína $\text{G}\alpha_q$ (Zhang et al, 2010). El efector clásico de las proteínas $\text{G}\alpha_q$ es la fosfolipasa C (PLC)- β (Rhee, 2001; Tilley, 2011), si bien también se han descrito interacciones con otros efectores como la PI3K (fosfatidil inositol 3 quinasa) (Golebiewska & Scarlata, 2008), p63RhoGEF (Lutz et al, 2005; Lutz et al, 2007) o PKC ζ y MEK5 (Garcia-Hoz et al, 2010). A consecuencia de la activación de la fosfolipasa C se produce la hidrólisis de fosfatidilinositol 4, 5 bifosfato (PIP2), dando inositol 1, 4, 5-trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG), los cuales actuarán como segundos mensajeros promoviendo una cascada de señalización intracelular (Bunney & Katan, 2011). El IP3 media la liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares, el cual es capaz de unirse a la proteína calmodulina (CAM). El complejo Ca^{2+} /CAM participa en la modulación de la función de varias proteínas como la CAMKII (Ca^{2+} /calmodulina quinasa II) o la calcineurina (CaN), entre otras proteínas, promoviendo su activación (Fracchia et al, 2013; Zarain-Herzberg et al, 2011) Estas proteínas participan en la activación de factores de transcripción como NFAT, modulando la regulación de la expresión de genes diana (Watanabe et al, 1994; Zhang et al, 2010). Por otro lado, el DAG producido promueve la activación de PKC, que conducirá a su vez a la activación de la señalización por MAPKs como ERK y JNK (Chen et al, 1998; Dorn & Force, 2005; Hakeda et al, 1997; Tokuda et al, 1999) (Figura I2).

La estimulación del receptor FP también puede promover la activación de la proteína Rho por asociación con la proteína $\text{G}\alpha_{12/13}$, lo que provoca cambios en el citoesqueleto y en la morfología celular (Pierce et al, 1999). También se ha descrito que el receptor FP puede acoplarse a una $\text{G}\alpha_i$ en hepatocitos y en tejidos renales, siendo responsable en estos últimos de la reabsorción de agua en los túbulos colectores (Hebert et al, 2005; Melien et al, 1998).

El receptor FP se encuentra ampliamente distribuido y su estimulación por $\text{PGF}_{2\alpha}$ tiene consecuencias funcionales importantes. Por ejemplo, además de en los tejidos renales, el FP se expresa en gran cantidad en tejidos como el ovario, el endometrio o el miometrio en los que, además de intervenir en las funciones normales del sistema reproductor femenino, tiene implicaciones en patologías como los adenocarcinomas endometriales en los que potencia la angiogénesis a través de la transactivación del receptor de EGF (*Epidermal*

Growth Factor) o la inducción del ARNm del VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) (Sales et al, 2005). Tanto el receptor como los agonistas del FP tienen gran importancia en tejidos oculares, donde actúan disminuyendo la presión intraocular, por lo que dichos agonistas son ampliamente utilizados para el tratamiento de glaucomas (Woodward et al, 2011). Otros estudios sugieren que la $\text{PGF}_{2\alpha}$ inhibe la resorción ósea por parte de los osteoclastos, actuando de este modo en la formación y remodelación del hueso (Kamon et al, 2008). Por otro lado, la activación del receptor FP también inhibe la diferenciación de células adiposas (Serrero & Lepak, 1997). Finalmente, la estimulación del receptor FP se ha asociado tanto con la proliferación de fibroblastos (Oga et al, 2009) como con el crecimiento hipertrófico en cardiomiocitos ventriculares de rata (Adams et al, 1996; Lai et al, 1996) y la $\text{PGF}_{2\alpha}$ parece tener consecuencias fisiopatológicas en el sistema cardiovascular, participando en la elevación de la presión sanguínea y promoviendo la aterosclerosis (Yu et al, 2009).

2.2. Acciones de $\text{PGF}_{2\alpha}$ sobre la activación de factores de transcripción

La estimulación con $\text{PGF}_{2\alpha}$ desencadena una serie de cascadas de señalización que incluyen la activación de PLC, la liberación de Ca^{2+} al citosol y la activación de PKC, que generalmente conlleva a la activación de la ruta de las MAP quinasas, capaces a su vez de fosforilar y activar factores de transcripción nucleares como Elk-1, Sap1, c-Jun y ATF2 entre otros. En particular, se ha descrito que la $\text{PGF}_{2\alpha}$, a través de la activación de la cascada Raf/MEK1/ERK, incrementa los niveles de ARN mensajero de *c-fos* y *c-jun*, componentes fundamentales del factor de transcripción AP-1, en células de cuerpo lúteo bovino (Chen et al, 2001).

Además de AP-1, la $\text{PGF}_{2\alpha}$ promueve el incremento la expresión del factor de transcripción Egr-1 (*Early growth response protein 1*) tanto en el cuerpo lúteo (Hou et al, 2008) como en cardiomiocitos de ratas neonatas (Hara et al, 2008; Xu et al, 2008). Por otro lado, los efectos inhibidores de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ sobre la diferenciación de adipocitos están mediados por su capacidad para inducir la expresión tanto del factor de transcripción HIF-1 α como de su efector DEC-1 bajo condiciones normales de oxígeno (Liu & Clipstone, 2008). La $\text{PGF}_{2\alpha}$ es también capaz de inducir el crecimiento de células de músculo esquelético a través de la activación del factor de transcripción NFAT (Horsley & Pavlath, 2003; Jansen & Pavlath, 2008).

3. Prostanoides y linfocitos T

Los prostanoides son importantes mediadores de los procesos inflamatorios, causando síntomas asociados como la fiebre, el dolor y el edema (Hirata & Narumiya, 2012). Si bien está claramente establecida la relevancia de las acciones de los prostanoides en el proceso inflamatorio por células del sistema inmune como los macrófagos, cada vez son más los estudios que muestran un papel de estos mediadores lipídicos en la modulación de la función y activación de otros tipos celulares del sistema inmune como los linfocitos T.

3.1. Activación de linfocitos T

La activación de los linfocitos T se desencadena tras el reconocimiento, por parte del receptor de la célula T (TCR, *T Cell Receptor*), del antígeno presentado en el contexto del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, *Major Histocompatibility Complex*). El TCR es un complejo multiproteico compuesto por un heterodímero ($\alpha\beta$ o $\gamma\delta$) responsable del reconocimiento antigénico, y por el complejo transductor de señales, formado por las cadenas CD3 (ϵ , γ , δ y ζ) que se asocian con el TCR como tres dímeros ($\epsilon\gamma$, $\epsilon\delta$, $\zeta\zeta$). Estas cadenas CD3 contienen motivos ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs*) en sus regiones citoplasmáticas responsables de transducir la señal desencadenada por el reconocimiento del antígeno. Además, la activación completa del linfocito T requiere la participación de moléculas coestimuladoras como CD4, CD8, LFA1 o CD28, capaces de proveer a las células de una segunda señal que las rescata de procesos anérgicos o apoptóticos (Chambers & Allison, 1997; Guy & Vignali, 2009; Lenschow et al, 1996; Smith-Garvin et al, 2009).

Tras el reconocimiento del antígeno, el primer paso en la señalización intracelular es la activación de proteínas tirosina quinasa (PTKs) de la familia Src (Lck y Fyn) que fosforilan los residuos de tirosina de las secuencias ITAM presentes en las regiones citoplasmáticas de las cadenas CD3. Le sigue el reclutamiento de PTKs de la familia ZAP-70/Syk, que fosforilan moléculas adaptadoras como LAT (*Linker for the Activation of T cells*) o SLP-76 (*SH2 domain-containing Leukocyte Phosphoprotein of 76 kDa*) cruciales para el reclutamiento de enzimas como la fosfolipasa C (PLC)- γ 1, la fosfatidilinositol-3 quinasa (PI3K) o la GTPasa p21Ras (Guy & Vignali, 2009; Smith-Garvin et al, 2009; van Leeuwen & Samelson, 1999).

La hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-difosfato (PIP2) por la PLC γ 1 genera dos segundos mensajeros: el inositol 1,4,5 - trifosfato (IP3) y el diacilglicerol (DAG), responsables de la activación de las múltiples cascadas de señalización importantes para las funciones del linfocito T (Szamel & Resch, 1995). El IP3 soluble es responsable del incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular que activa, entre otras enzimas, a la fosfatasa Calcineurina, determinante en la activación del factor de transcripción NFAT (Oh-hora & Rao, 2008; Rao et al, 1997). El DAG unido a la membrana puede activar proteínas como RasGRP1 (*Ras guanyl nucleotide-releasing protein 1*) o la proteína quinasa C (PKC)- θ , lo que resulta en la activación de las rutas Ras-MEK1/2-ERK1/2-AP1 e IKK-NF κ B,

respectivamente, que terminan con la activación de los factores de transcripción AP-1 y NFκB (Berridge, 1997; Gorentla et al, 2011; Monks et al, 1997; Werlen et al, 1998).

3.2. Factores de transcripción en la activación de linfocitos T

Como consecuencia de la compleja cascada de eventos que tienen lugar durante el proceso de activación del linfocito T, se produce la inducción transcripcional de un gran número de genes implicados en los procesos asociados a la activación celular y la respuesta inmune, entre los que se encuentran los genes de citoquinas como IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, Interferón (IFN)-γ, del factor de necrosis tumoral (TNF)-α, y del factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) (Altman et al, 1990; Ullman et al, 1990). La inducción transcripcional de estos genes tiene lugar esencialmente tras la activación de varios factores de transcripción entre los que destacan NF-κB, AP-1 y NFAT (Manicassamy et al, 2006).

3.2.1. El factor de transcripción NFκB

El factor de transcripción NF-κB es crítico para la activación y la supervivencia de los linfocitos T. NF-κB es el nombre genérico que se usa para describir a un conjunto de factores de transcripción diméricos que se caracterizan por poseer una región muy conservada en el extremo amino terminal de la proteína denominada Dominio de Homología Rel (RHD). Esta región es responsable de la dimerización, de la translocación al núcleo, de la unión al ADN y de la interacción con las proteínas inhibitoras IκB (Ghosh et al, 1998). En células en reposo, el dímero NF-κB se encuentra secuestrado en el citoplasma por estar unido a la proteína inhibidora IκB. En respuesta a diferentes estímulos de activación T, la quinasa IKK (*IκB Kinase*) fosforila a IκB, lo que genera una señal de ubiquitinación y degradación en el proteasoma, liberando a NF-κB y permitiendo su translocación al núcleo (Manicassamy et al, 2006).

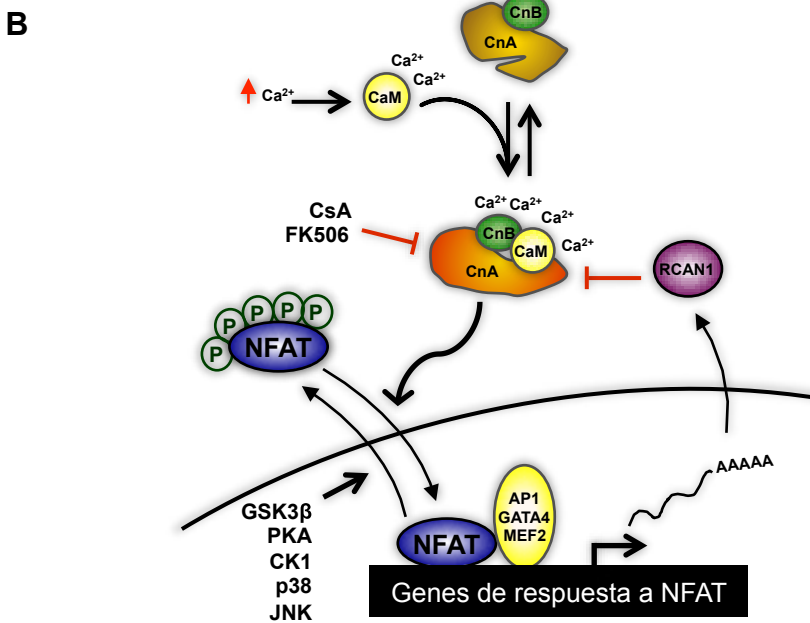
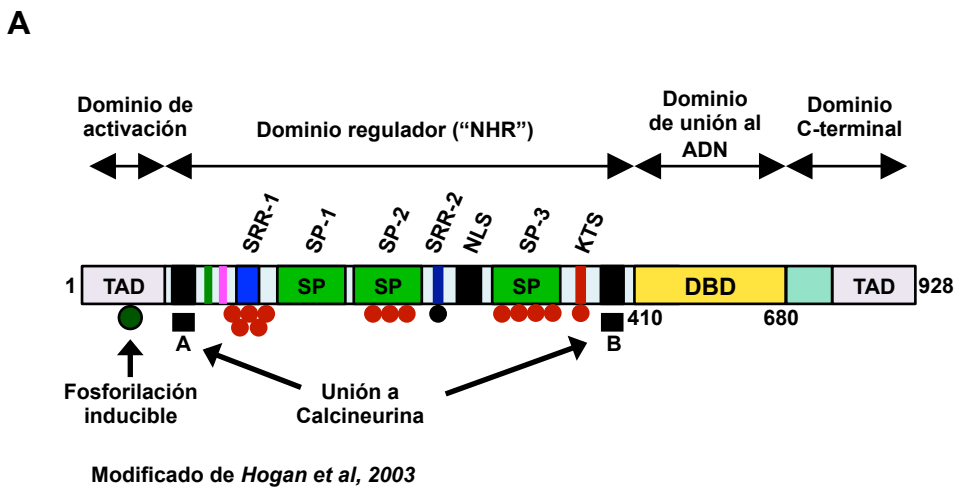
3.2.2. El factor de transcripción AP-1

Las proteínas AP-1 (*Activating Protein-1*), son homodímeros y heterodímeros de miembros de las familias Jun (c-jun, JunB y JunD), Fos (c-fos, FosB, Fra1 y Fra2), JDP (*Jun dimerization partners* JDP1 y JDP2) y ATF (*Activating transcription factors* ATF2, LRF1/ATF3 y B-ATF). Estos componentes pertenecen al grupo de proteínas de unión al ADN que contienen un sitio bZIP (*basic region leucine zipper*) y se caracterizan por su localización nuclear. AP-1 está involucrado en la transcripción de varios genes que contienen secuencias TRE (*TPA-Responsive Element*) en sus regiones promotoras, y puede unirse también, aunque con menor afinidad, a elementos CRE (*cAMP Response Element*) (Alberini, 2009; Jochum et al, 2001; Manicassamy et al, 2006; Shaulian & Karin, 2001). Existen diversos mecanismos responsables de inducir la actividad de AP-1 en respuesta a estímulos externos. Por ejemplo, en respuesta a factores de crecimiento, la cascada de la MAPK ERK fosforila los llamados factores TCFs (*Ternary Complex Factors*) que inducen la expresión de los genes fos. Las proteínas fos forman entonces heterodímeros Jun-Fos que inducen la transcripción de c-jun ya que este gen contiene elementos de respuesta a AP-1 en su

promotor. La activación de ERK también puede contribuir a la inducción transcripcional de c-jun a través de la fosforilación de los factores de transcripción MEF2 que se unen al promotor de c-jun. Por otra parte, las respuestas a citoquinas proinflamatorias y a la radiación ultravioleta son dependientes principalmente de las cascadas de MAPK JNK y p38 (Karin, 1995; Shaulian & Karin, 2001).

3.2.3. El factor de transcripción NFAT

NFAT es una familia de factores de transcripción descritos inicialmente en linfocitos T (*Nuclear Factor of Activated T Cells*) aunque actualmente se ha descrito su expresión tanto en otros tipos celulares del sistema inmune como en tipos celulares y tejidos fuera del sistema inmune como músculo esquelético, neuronas, corazón y adipocitos (Porter et al,



Modificado de Rothermel et al, 2003

2000). La familia de factores NFAT está compuesta por 5 miembros: NFAT1 (c2 o p), NFAT2 (c1 o c), NFAT3 (c4), NFAT4 (c3 o x) y NFAT5. Todos ellos, excepto NFAT5, de localización constitutivamente nuclear y con estructura y regulación diferentes al resto, se expresan en el citoplasma de células en reposo y se caracterizan por presentar dos secuencias de gran homología entre los diferentes miembros: el dominio de unión a ADN (*DNA Binding Domain* “DBD”) y la región homóloga para NFAT (NFAT Homology Region “NHR”). El DBD presenta una homología moderada con el dominio de unión a ADN de la familia de proteínas Rel/NFκB, mientras que la región NHR, situada en el extremo amino terminal de la proteína, constituye su dominio principal de regulación y transactivación (Ortega-Perez & Redondo, 2000). En esta región NHR se encuentran además los sitios de unión de calcineurina y las regiones ricas en serinas que pueden ser fosforiladas, dianas tanto de la acción de la fosfatasa calcineurina como de serina quinasas que fosforilan y regulan la actividad de NFAT (Okamura et al, 2004) (Figura I3).

La activación de NFAT requiere de un incremento de los niveles de Ca^{2+} intracelular y está regulada por la acción de la fosfatasa calcineurina. En células en reposo, NFAT se encuentra altamente fosforilado y localizado preferentemente en el citoplasma. Los estímulos que provocan un aumento del Ca^{2+} intracelular activan la fosfatasa calcineurina, cuya actividad es dependiente del sistema Ca^{2+} /Calmodulina (CaM) y es inhibida por

Figura I3: (A) Estructura de las proteínas NFAT (basado en la estructura del NFATc2 murino). Los círculos rojos representan grupos fosfato eliminados por la calcineurina, mientras que el círculo negro en la región SRR-2 representa un grupo fosfato que no es susceptible a la desfosforilación por calcineurina. Se muestran las dos regiones involucradas en la unión con calcineurina. La región A es la secuencia PxlIT encontrada en todas las proteínas NFAT, mientras que la región B se ha descrito en NFATc1 y NFATc3. (TAD) Dominios de transactivación; (NLS) *Nuclear localization signal*. Otra señal de localización nuclear adicional se encuentra localizada en el dominio de unión al ADN; (SRR) *Serine-rich gatekeeper region*; (SP) Secuencias Ser-Pro; (KTS) Motivo rico en Serinas **(B)** Regulación de NFAT: El heterodímero calcineurina es activado tras la unión de Ca^{2+} y de Calmodulina (CaM). La subunidad A de la calcineurina (CnA) contiene un dominio catalítico N-terminal y varias regiones de unión tanto a la subunidad B reguladora (CnB) como a la CaM. La región C-terminal contiene un dominio autoinhibitorio que se pliega e inhabilita el sitio activo de la enzima cuando la CaM no está unida. El aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular promueven la unión del Ca^{2+} tanto directamente al dominio CnB como del complejo Ca^{2+} /CaM al dominio CnA, cambiando la conformación y desplazando el dominio autoinhibitorio de la calcineurina. La desfosforilación de NFAT por parte de esta calcineurina activada promueve su translocación desde el citoplasma al núcleo, donde NFAT se une de manera cooperativa con otros factores de transcripción como AP1, GATA4 o MEF2. Los sitios de unión a NFAT en el promotor de RCAN1 lo definen como un gen de respuesta a calcineurina. Cuando la calcineurina se activa, RCAN1 es sintetizado y se une directamente a la calcineurina inhibiendo su actividad, estableciéndose así una autorregulación por *feedback* negativo. Otras proteínas quinasa regulan negativamente este sistema al fosforilar a NFAT e inducir así su translocación de vuelta al citoplasma. (GSK3β) Glucógeno Sintasa Quinasa-3β; (PKA) Proteína Quinasa A; (CK1) Caseína Quinasa 1; (JNK) c-Jun N-terminal Quinasa.

acción de las drogas inmunosupresoras ciclosporina A (CsA) y FK506. La activación de la calcineurina conduce a la desfosforilación de serinas presentes en la región reguladora de NFAT (NHR). Este dominio está altamente fosforilado en células en reposo, con los residuos fosforilados distribuidos en 4 motivos (SRR-1, SPxx, SRR-2 y KTS) (Hogan et al, 2003; Okamura et al, 2004). La calcineurina desfosforila 3 de estos 4 motivos, lo que provoca un cambio conformacional en la proteína que expone una señal de localización nuclear, permitiendo la translocación de NFAT al núcleo. Una vez allí, se une al ADN de forma individual o formando parte de complejos con otros factores de transcripción para activar la transcripción de genes específicos dependiendo del tipo celular (Hogan et al, 2003) (Figura I3). La estancia de NFAT en el núcleo viene determinada por la duración del incremento de los niveles de Ca^{2+} intracelular y por la activación de determinadas quinasas que promueven su refosforilación y consiguiente exportación al citoplasma, como son la caseína quinasa 1 (CK1), la proteína quinasa A (PKA) y la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3). Existen además quinasas inducibles como MAPK p38 y JNK que confieren una especificidad adicional por presentar diferentes afinidades por los distintos miembros de la familia NFAT (Chow et al, 1997; Porter et al, 2000). Al igual que otros factores de transcripción, la actividad transcripcional de NFAT también puede ser regulada por la modificación del dominio de transactivación, como es el caso de la interacción con NFATc2 de CK1 (Okamura et al, 2004) o de PKC ζ (San-Antonio et al, 2002).

Una regulación indirecta de NFAT se da a través de la inhibición de la fosfatasa calcineurina. Entre las proteínas que regulan la calcineurina se encuentran las inmunofilinas, a las que se unen los fármacos CsA y FK506, las proteínas Cabin-1/Cain, la proteína AKAP79 o la familia de proteínas RCAN (*Regulator of Calcineurin*) (Leinwand, 2001). En el caso de RCAN1 (y en concreto la isoforma RCAN1-4), este gen se induce por la vía de Ca^{2+} /NFAT al poseer sitios de unión para dicho factor de transcripción en su región promotora. Por lo tanto, al interactuar RCAN1 con la calcineurina e inhibirla, ocurre un proceso de regulación por retroalimentación negativa que inhibe la propia síntesis de RCAN1 al bloquearse la desfosforilación de NFAT (Park et al, 2009).

3.3. Acciones y relevancia de prostanoïdes en linfocitos T

Durante el proceso de activación del linfocito T se produce la inducción transcripcional de un gran número de genes implicados en el proceso de respuesta inmune, como son las citoquinas. Si bien está claramente establecida la función esencial de éstas en la regulación de la respuesta inmune, no se conoce en detalle el papel de otros mediadores inflamatorios como los prostanoïdes en la función de los linfocitos T. Estudios realizados en nuestro laboratorio han puesto de manifiesto la inducción de COX-2 de manera temprana tras la activación del linfocito (Iniguez et al, 1999), con un papel esencial de NFAT en dicha inducción (Iniguez et al, 2000). Por otro lado, el tratamiento con AINEs específicos de COX-2, inhibe la proliferación de los linfocitos T así como la transcripción de genes clave en la respuesta inmune como IL-2, TNF- α e IFN- γ (Iniguez et al, 1999). Por su parte, cada vez son más los estudios que ponen de manifiesto la importancia de los diferentes prostanoïdes como moduladores de la respuesta inmune a través de sus acciones sobre la

activación y función de linfocitos T.

Con respecto a la PGI_2 , aunque no se ha demostrado la presencia de PGIS en células T, se ha visto que los linfocitos son capaces de producir este prostanoide a través de un mecanismo denominado “biosíntesis transcelular” cuando se co-cultivan con células HUVEC (*Human Vascular Endothelial Cells*) (Merhi-Soussi et al, 2000). Además, los linfocitos Th1 y Th2 expresan el receptor IP, habiéndose descrito que la PGI_2 es capaz de inhibir tanto la diferenciación de los linfocitos T $CD4^+$ hacia el linaje Th1, como su función, al suprimir la producción de IFN γ por parte de éstos. La PGI_2 también impide una presentación de antígeno óptima por parte de las células dendríticas a los linfocitos T $CD4^+$, inhibiendo la diferenciación hacia el linaje Th2, así como la secreción de IL-4, IL-5 e IL-13, citoquinas propias de este tipo celular (revisado en Boswell et al, 2011). La señalización a través del IP promueve la diferenciación de linfocitos T hacia el linaje Th17, debido en parte a una reducción de la expresión de IL-12 y/o a un incremento de IL-23 secretado por células dendríticas o monocitos (Boswell et al, 2011).

El TXA_2 es producido principalmente en plaquetas, aunque también en monocitos activados, macrófagos y células dendríticas (Narumiya, 2003). Aunque hay evidencias limitadas acerca de la expresión de la TXAS en células T, se sabe que el receptor TP se expresa en grandes cantidades en timocitos inmaduros, en los que la señalización a través de este receptor induce apoptosis, lo que sugiere un papel del TXA_2 en la maduración de las células T (Lone & Tasken, 2013; Ushikubi et al, 1993). La señalización a través del TP también regula negativamente la interacción entre las células dendríticas y las células T, inhibiendo su proliferación (Kabashima et al, 2003).

La PGD_2 , producida principalmente en mastocitos, se ha asociado tradicionalmente con procesos pro-inflamatorios alérgicos como el asma o la dermatitis atópica, aunque es capaz de ejercer también funciones anti-inflamatorias inmunológicamente relevantes (Ricciotti & FitzGerald, 2011). Las células T activadas que expresan COX-2 y la sintasa H-PGDS también son capaces de producir tanto PGD_2 como su derivado, la ciclopentenona 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ - PGJ_2 (Feldon et al, 2006). La PGD_2 procedente de mastocitos, señalizando a través del receptor DP2/CRTH2, incrementa la secreción de IL-4, IL-5 e IL-13, así como de las proteínas proinflamatorias CD11b y CD40L, en células Th2, mientras que señalizando a través del receptor DP1 reduce el número de células $CD4^+$ y $CD8^+$ que secretan IFN γ e IL-2, promoviendo de esta manera las funciones Th2 sobre las Th1, lo que sería relevante en las respuestas alérgicas donde la actividad Th2 es elevada (Tanaka et al, 2004). Por otro lado, la 15d- PGJ_2 participa en la resolución de los procesos inflamatorios llevados a cabo por células Th1, al inhibir la activación de NF κ B (Trivedi et al, 2006). La 15d- PGJ_2 también es capaz de inhibir la producción de IL-2 por parte de los linfocitos T al promover la interacción entre PPAR γ y NFAT (Yang et al, 2000). Aparte de sus funciones pro- y anti-inflamatorias, tanto la PGD_2 como la 15d- PGJ_2 también influyen en la función de las células T regulando procesos de proliferación y de apoptosis (revisado en Lone & Tasken, 2013).

La PGE_2 presenta acciones pro-inflamatorias, estando involucrada en todos los procesos que dan lugar a los signos clásicos de inflamación: enrojecimiento, edema y dolor (Ricciotti & FitzGerald, 2011). En cuanto a las funciones que desempeña sobre los linfocitos T, la PGE_2 ha sido inicialmente considerada como molécula inmunosupresora debido a su capacidad para inhibir la activación y la proliferación de este tipo celular. Revisado en (Lone & Tasken, 2013; Ricciotti & FitzGerald, 2011; Sreeramkumar et al, 2012). Sin embargo, estudios recientes ponen de manifiesto un papel pro-inflamatorio de la PGE_2 en la diferenciación de las células T. La señalización de la PGE_2 a través del receptor EP4 presente en células dendríticas y linfocitos T, no sólo media la diferenciación del linaje Th1, sino que amplifica la expansión de las células Th17 mediada por IL-23, promoviendo la respuesta inflamatoria en modelos animales de enfermedades como la esclerosis múltiple o la artritis reumatoide (Boniface et al, 2009; Chizzolini et al, 2008; Napolitani et al, 2009; Sakata et al, 2010; Yao et al, 2009).

En cuanto a la $PGF_{2\alpha}$, no parece haber evidencias de su síntesis en células T (Lone & Tasken, 2013), si bien estudios recientes ha demostrado el papel de esta prostaglandina en promover la diferenciación de las células Th17 durante los procesos alérgicos que cursan con alteraciones respiratorias (Li et al, 2011). La $PGF_{2\alpha}$, junto con la PGI_2 , promueve la diferenciación de los linfocitos T hacia el linaje Th17, señalizando a través de sus respectivos receptores de una forma autocrina.

4. Prostanoides en la fisiopatología cardiaca

En el sistema cardiovascular, los prostanoides modulan la patogénesis de enfermedades como la trombosis y la aterosclerosis a través de diversos procesos como la agregación plaquetaria, la vasodilatación y vasoconstricción y la respuesta inflamatoria local (Iniguez et al, 2008; Kobayashi et al, 2004; Vila, 2004). Mediante el uso de anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs) como inhibidores farmacológicos de las COXs y animales genéticamente deficientes en enzimas responsables de la síntesis de prostanoides o en sus receptores, se ha puesto de manifiesto la importancia de las acciones mediadas por estos mediadores lipídicos en la fisiología cardiovascular (Belton & Fitzgerald, 2003; Burleigh et al, 2002; FitzGerald et al, 2001; Fosslie, 2005; Martinez-Gonzalez & Badimon, 2007; Ray et al, 2002). Sin embargo, la retirada del mercado de ciertos AINEs selectivos para la COX-2 a causa de sus efectos adversos en pacientes con riesgo cardiovascular ha abierto el debate sobre el papel de los prostanoides derivados de la COX-2 en la patología cardiovascular y sobre los beneficios y riesgos del uso de inhibidores de la COX en la enfermedad cardiovascular (Iniguez et al, 2008).

De los diversos eicosanoides, el TXA_2 y la PGI_2 son considerados tradicionalmente los más importantes en el control de la homeostasis del sistema cardiovascular (Bunting et al, 1983; Cheng et al, 2002; Davidge, 2001). Estos prostanoides son sintetizados principalmente por plaquetas y endotelio vascular respectivamente, presentando actividades biológicas opuestas. Mientras que el TXA_2 (derivado principalmente de la acción de COX-1 de plaquetas) es un potente vasoconstrictor, a la vez que un inductor de la agregación

plaquetaria (FitzGerald et al, 2000), la PGI_2 (generada a partir de la COX-2 de endotelio) tiene un importante efecto vasodilatador, antagonizando las acciones del TXA_2 sobre la agregación plaquetaria, a la vez que regula el crecimiento de la musculatura lisa vascular (Iniguez et al, 2008).

Estudios realizados con ratones deficientes en receptores de prostanoïdes han puesto de manifiesto las funciones cardioprotectoras de la PGE_2 , actuando a través de su receptor EP4, en los procesos de isquemia/reperfusión derivados del infarto agudo de miocardio (Hishikari et al, 2009; Xiao et al, 2004). La PGD_2 sintetizada por la L-PGDS también se ha descrito como molécula protectora del daño generado por isquemia/reperfusión (Tokudome et al, 2009). Sin embargo, en otras patologías como la arteriosclerosis, estos prostanoïdes parecen tener funciones opuestas. En este sentido, el balance entre mPGES-1/L-PGDS es uno de los principales determinantes de la inestabilidad de la placa aterosclerótica en humanos (Cipollone et al, 2004). Mientras que la liberación de PGE_2 vía COX-2/mPGES-1 en macrófagos induce la expresión y activación de metaloproteínas responsables de la inestabilidad de la placa de ateroma (Pavlovic et al, 2006), la PGD_2 , sintetizada a través de la L-PGDS, es la precursora de la 15-dPGJ₂, a la que se le han atribuido acciones anti-inflamatorias y anti-ateroscleróticas (Li et al, 2004). Por su parte, se ha descrito que la $\text{PGF}_{2\alpha}$ eleva la presión sanguínea en ratones anestesiados, de tal forma que la eliminación del FP reduce significativamente la presión sanguínea en estos animales (Yu et al, 2009). Estos efectos de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ se deben en parte a su capacidad vaso-constrictora al inducir la contracción del músculo liso vascular (Basu, 2007; Basu, 2010; Zhang et al, 2010). También se ha descrito que la activación del receptor FP, presente en tejidos renales, regula la diferenciación de las células del aparato yuxtaglomerular que contienen renina, aumentando la expresión de esta enzima clave del sistema renina-angiotensina-aldosterona que induce la reabsorción de sales y agua, participando así en la generación de hipertensión y en el desarrollo de arteriosclerosis (Yu et al, 2009; Zhang et al, 2010).

En este trabajo nos hemos centrado en el estudio de las acciones de prostanoïdes como la $\text{PGF}_{2\alpha}$ en la hipertrofia cardíaca.

4.1. Hipertrofia cardíaca

La hipertrofia cardíaca se define como un incremento del grosor de la pared y/o el septo interventricular y se caracteriza, a nivel celular por un incremento del tamaño del cardiomiocito, con aumento de la síntesis proteica y un cambio en la organización de la estructura sarcomérica (Carreno et al, 2006). Clásicamente, se ha explicado la hipertrofia cardíaca como una respuesta adaptativa del miocardio frente a la situación que la origina. Durante el crecimiento, el embarazo y la práctica de actividad física intensa, la respuesta a la sobrecarga hemodinámica se caracteriza por un aumento del tamaño de los miocitos, sin aumento de la fibrosis intersticial y sin compromiso funcional. Este tipo de respuesta se ha denominado hipertrofia cardíaca fisiológica y cumpliría una función de adaptación (Frey & Olson, 2003). Sin embargo, algunas hipertrofias se acompañan de aumento de fibrosis intersticial, mayor incidencia de apoptosis, disminución de la densidad capilar y

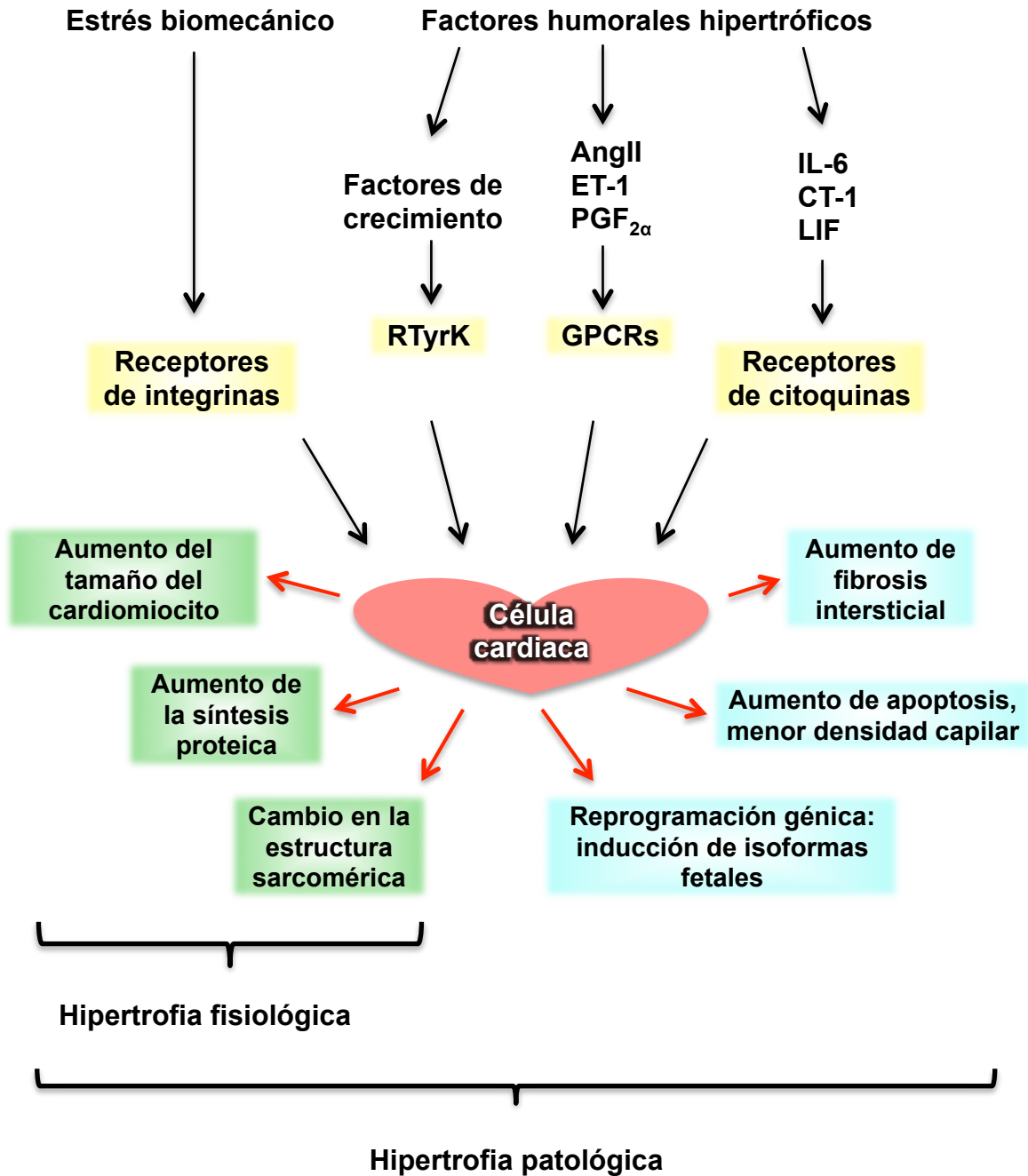


Figura I4: Señales y receptores implicados en el desarrollo de hipertrofia cardíaca. Se describe el fenotipo diferenciado entre hipertrofia fisiológica y patológica. (RTyrK) Receptores Tirosina Quinasa; (GPCRs) Receptores acoplados a proteínas G. La hipertrofia cardíaca se caracteriza, celularmente, por un incremento del tamaño de cardiomiocito, con aumento de la síntesis proteica y un cambio en la organización de la estructura sarcomérica (hipertrofia fisiológica). La hipertrofia patológica se acompaña además de un aumento de fibrosis intersticial, mayor incidencia de apoptosis, disminución de la densidad capilar y reprogramación de la expresión génica con inducción de genes fetales y represión de los genes que codifican las respectivas isoformas del adulto, dando lugar a un deterioro de la función ventricular que evoluciona a insuficiencia cardíaca.

reprogramación de la expresión génica con inducción de genes fetales y represión de los genes que codifican las respectivas isoformas del adulto. Estas alteraciones en la estructura del miocardio se asocian con deterioro de la función ventricular evolucionando habitualmente a insuficiencia cardíaca, por lo que a este tipo de hipertrofia se la define como hipertrofia cardíaca patológica (Frey & Olson, 2003; McKinsey & Olson, 1999). La hipertrofia miocárdica prolongada es un factor de riesgo de gran importancia para el desarrollo de insuficiencia cardíaca (Carreno et al, 2006), por lo que es utilizada como factor predictivo importante en el desarrollo de la enfermedad cardíaca (Rohini et al, 2010).

El crecimiento hipertrófico de los cardiomiocitos se inicia por factores endocrinos, paracrinos y autocrinos que estimulan una amplia variedad de receptores unidos a membrana, entre los que destacan aquéllos pertenecientes a la familia de GPCRs (Frey & Olson, 2003).

4.2. GPCRs y señalización intracelular en hipertrofia cardíaca

Diversas señales extracelulares promotoras de hipertrofia cardíaca desencadenan su efecto a través de la activación de receptores de membrana que, a su vez, activan vías de señalización intracelular que promueven una cascada de moléculas efectoras responsables del desarrollo de la respuesta hipertrófica. Existen varios tipos de receptores implicados en la hipertrofia cardíaca. Por un lado, los receptores con actividad intrínseca de tirosina quinasa (RTyrK) activados por factores de crecimiento como el factor de crecimiento transformante tipo β (TGF- β), el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento análogo a la insulina (IGF) entre otros (Carreno et al, 2006). La participación de éstos puede ser de forma directa tras su activación por ligandos o tras la transactivación a través de algunos receptores acoplados a proteínas G (GPCR) como el receptor de angiotensina AT₁ en el caso del EGFR (Zhai et al, 2006). Por otro lado, los miembros de la familia de citoquinas de la interleuquina 6 (la IL-6, la cardiotrofina-1, CT-1 y el factor inhibidor de la leucemia, LIF) también están implicados en el desarrollo de hipertrofia cardíaca patológica (Terrell et al, 2006). Otros receptores involucrados en el desarrollo de hipertrofia cardíaca son las integrinas que, debido a que conectan el aparato contráctil de los miocitos a las proteínas de la matriz extracelular, actúan como sensores de estiramiento de la sobrecarga hemodinámica (Brancaccio et al, 2006) (Figura 14).

Muchas de las señales extracelulares que desempeñan un papel relevante en el crecimiento del cardiomiocito y la hipertrofia cardíaca, desencadenan su efecto a través de la activación de GPCRs. Entre éstos, destacan los receptores α 1-adrenérgicos para epinefrina y norepinefrina, el receptor AT₁ para angiotensina II (AngII) y el receptor ET para endotelina-1, todos los cuales han sido relacionados con el desarrollo de hipertrofia cardíaca patológica y su progreso a insuficiencia cardíaca (Carreno et al, 2006; Hunter & Chien, 1999; Molkentin & Dorn, 2001). Estos receptores se asocian principalmente con proteínas G de la familia G α q/11, que tiene un papel esencial no sólo en el desarrollo de hipertrofia cardíaca (Esposito et al, 2002) sino también en el desarrollo cardíaco embrionario (Offermanns et

al, 1998). Estudios realizados en ratones transgénicos muestran que la sobre-expresión de Gαq en corazón es suficiente para desencadenar una hipertrofia similar a la desarrollada en condiciones de sobrecarga de presión, llevando asociada una inducción de la expresión de genes fetales (D'Angelo et al, 1997; Liggett, 2006).

4.2.1. GPCRs y activación de MAPKs

El efector clásico de los GPCRs acoplados a proteínas Gαq en el corazón es PLC-β (Filtz et al, 2009; Tilley, 2011), la cual promueve la liberación de IP₃ y DAG. El DAG promueve la activación de la PKC, responsable de iniciar la ruta de las MAPKs, siendo ésta una de las principales rutas por las que la Gαq media las respuestas de crecimiento celular en el corazón (Kehat & Molkentin, 2010). Existen cuatro subfamilias clásicas de MAPKs: ERK1/2 (*Extracellular signal-regulated kinases*), JNK1, -2 y -3 (*c-Jun NH₂-terminal kinases*), p38 (α, β, γ, δ) y ERK5, con diferente grado de implicación en la hipertrofia cardiaca.

La implicación de ERK1/2 en la regulación de la hipertrofia cardiaca es un tema de continuo debate. Si bien se ha descrito que la activación de ERK1/2 contribuye a la inducción de hipertrofia en cardiomiocitos en cultivo y en modelos animales (Bueno & Molkentin, 2002), la inhibición directa de esta quinasa en el corazón, no es capaz de reducir la hipertrofia generada por diversos estímulos patológicos (Purcell et al, 2007). En el caso de JNK, los primeros estudios indicaban un papel pro-hipertrófico de esta MAPK en cardiomiocitos en cultivo (Choukroun et al, 1998; Wang et al, 1998b) y en modelos animales (Choukroun et al, 1999). Sin embargo, estudios más recientes han puesto en duda el papel de JNK como agente pro-hipertrófico (Liu et al, 2009; Sadoshima et al, 2002; Tachibana et al, 2006), sugiriéndose que JNK presentaría incluso un papel anti-hipertrófico, actuando en parte a través de la exclusión de NFAT del núcleo (Liang et al, 2003; Molkentin, 2004) o de la activación de JunD (Hilfiker-Kleiner et al, 2006; Hilfiker-Kleiner et al, 2005). De forma similar, aunque diversos estudios realizados *in vitro* sugerían que p38 promovía el crecimiento cardiaco y la hipertrofia (Nemoto et al, 1998; Wang et al, 1998a; Zechner et al, 1997), otros estudios apuntan a que p38 no es necesaria en el desarrollo de hipertrofia inducida por agonistas en cardiomiocitos en cultivo (Choukroun et al, 1998) o en modelos animales *in vivo* (Liao et al, 2001).

4.2.2. GPCRs y activación de Calcineurina/NFAT

La producción de IP₃ tras la activación de un GPCR asociado a Gαq desencadena la liberación de Ca²⁺ al citosol, donde se une a CaM. Los complejos Ca²⁺/CaM modulan la función de numerosas proteínas entre las que destacan la CaMKII y la CaN, dos proteínas que participan en el desarrollo normal del corazón y que se encuentran alteradas durante el proceso de hipertrofia cardiaca (Mishra et al, 2010; Zarain-Herzberg et al, 2011).

La fosfatasa CaN es esencial en la activación del factor NFAT y la transcripción de genes dependientes de este factor, como se describe en detalle en el apartado 3.2.3. y la Figura I3. Los trabajos de Molkentin et al. con ratones transgénicos que expresan en corazón formas constitutivamente activas tanto de calcineurina como de NFATc4, demostraron que

la activación de estas proteínas era necesaria y suficiente para producir una hipertrofia cardíaca que resultaba en una cardiomiopatía dilatada con fibrosis intersticial, fallo cardíaco congestivo y muerte súbita (Molkentin et al, 1998). Posteriormente se han publicado numerosos trabajos que dan cuenta de la importancia de la ruta de Calcineurina/NFAT en la generación de hipertrofia cardíaca, tanto en modelos *in vitro* con cardiomiocitos de ratas neonatas (Haq et al, 2000; Taigen et al, 2000; van Rooij et al, 2002), como en modelos *in vivo* con ratones (Bueno et al, 2002; De Windt et al, 2001; Hill et al, 2002; Rothermel et al, 2001; van Rooij et al, 2004; Zou et al, 2001). La sobreexpresión de los dominios de unión a calcineurina de Cain o AKAP79 (Taigen et al, 2000), la sobreexpresión de RCAN1 (Rothermel et al, 2001), de un dominante negativo de la calcineurina (Bueno et al, 2002) o de un mutante constitutivamente activo de GSK3 β (Haq et al, 2000) causan una inhibición significativa en varios modelos de hipertrofia cardíaca. Por su parte, la inhibición directa de NFAT mediante el uso de un dominante negativo consistente en la región N-terminal de NFATc4 donde reside la secuencia de interacción con calcineurina, también es capaz de inhibir la hipertrofia de cardiomiocitos en cultivo inducida por cardiotrofina-1, endotelina-1 o por la presencia de una calcineurina constitutivamente activa (van Rooij et al, 2002). El uso de ratones transgénicos que expresan el gen de la luciferasa bajo el control de un promotor mínimo con 9 sitios de unión a NFAT, ha permitido definir que la actividad dependiente de NFAT incrementa en casos de hipertrofia inducida por sobrecarga de presión o por fallo cardíaco asociado a una intervención TAC (*Transverse Aortic Constriction*), pero no aumenta en modelos de hipertrofia fisiológica inducida por el ejercicio (Wilkins et al, 2004). En conjunto, éstos y otros estudios apoyan la teoría de que la ruta de calcineurina/NFAT estaría implicada esencialmente en el proceso de hipertrofia patológica frente a la fisiológica (Tanaka et al, 1998).

4.3. Genes marcadores de hipertrofia

La inducción de las diferentes vías de activación intracelulares que participan en el proceso hipertrófico se traduce en cambios en la expresión génica. Algunos de estos cambios, como la re-expresión de genes fetales, se consideran marcadores moleculares de hipertrofia patológica, ausentes en condiciones de crecimiento ventricular fisiológico.

Péptidos natriuréticos ANP (*Atrial Natriuretic Peptide*) y BNP (*B-type Natriuretic Peptide*): En respuesta a una sobrecarga de presión y de volumen sanguíneos, tanto los cardiomiocitos como los fibroblastos cardíacos sintetizan y secretan ANP y BNP (Dries, 2010). Estos péptidos circulan como hormonas por el torrente sanguíneo, actuando en varios tejidos corporales induciendo vasodilatación, natriuresis y diuresis (Daniels & Maisel, 2007). Los péptidos natriuréticos, señalizando a través de sus receptores, tienen diferentes efectos según el tejido donde actúen. Así, sus propiedades hipotensivas se deben a sus efectos sobre la permeabilidad del endotelio (McKay & Huxley, 1995), a que incrementan la tasa de filtración glomerular al elevar la presión en los capilares del glomérulo (Marin-Grez et al, 1986), y a que inhiben la reabsorción de sodio y agua en las nefronas al reducir la secreción de renina (Harris et al, 1987). Además, poseen propiedades vaso- y bronco-dilatadoras por sus acciones sobre la relajación del músculo liso a través de un mecanismo

que implica la proteína quinasa G1 (PKG1) y la disminución de la concentración de calcio intracelular (Alioua et al, 1998; Swayze & Braun, 2001). ANP y BNP también tienen efectos directos en el corazón, independientes de sus acciones como hipotensivos, al inhibir la hipertrofia y la fibrosis cardiaca (London, 2006; Nishikimi et al, 2011; Potter et al, 2006).

Cadena pesada de la miosina- β (β -MHC o Myh7): La miosina contiene dos cadenas pesadas (MHC, de *Myosin Heavy Chain*) y cuatro ligeras (MLC, por *Myosin Light Chain*) y es una de las principales proteínas que componen los músculos cardíaco y esquelético, y es responsable de la transducción de energía y desarrollo de fuerza en estos tejidos (Harrington & Rodgers, 1984). Se ha puesto especial interés en el estudio de las isoformas de la cadena pesada de la miosina debido a que los cambios en la proporción de estas proteínas parecen estar directamente relacionadas con el nivel de trabajo mecánico del corazón (Swynghedauw, 1986). En ratas y ratones, la isoforma β -MHC es la que se expresa principalmente durante el desarrollo del corazón, pero es reemplazada por la isoforma α -MHC tras el nacimiento. En condiciones de hipertrofia y fallo cardíaco, la expresión de la isoforma β se induce de nuevo junto con otros genes cardíacos fetales. En humanos, aunque la isoforma predominante tanto en el feto como en el adulto es la β , también existe una disminución del ratio α -MHC/ β -MHC en condiciones de fallo cardíaco (Kuwahara et al, 2012). Mutaciones en el gen que codifica para la isoforma β -MHC se han asociado con casos de Cardiomiopatía Hipertrófica Familiar, una enfermedad autosómica dominante caracterizada por el desarrollo de hipertrofia ventricular izquierda, desajustes en la estructura sarcomérica, fallo congestivo y muerte súbita (Watkins et al, 1992).

Otros marcadores hipertróficos: La α -actina esquelética (SkA), además de ser uno de los componentes principales de los filamentos finos en las fibras musculares esqueléticas del adulto, es una isoforma de la actina presente en el corazón durante sus estadios fetales. Tras el nacimiento, la expresión ventricular de esta proteína disminuye, y el gen se silencia en el miocardio ventricular del adulto sano (Kuwahara et al, 2012). En el corazón hipertrofiado, sin embargo, la expresión de SkA se ve inducida (Karns et al, 1995; MacLellan et al, 1994). Otros genes fetales re-inducidos en condiciones de fallo cardíaco e hipertrofia en el corazón adulto son los genes que codifican para canales iónicos como los canales HCN (*Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels*) o los canales de Ca^{2+} tipo T (Kuwahara et al, 2012).

4.4. Prostanoides en hipertrofia cardiaca

Existen varios trabajos que ponen de manifiesto la participación de los prostanoides en la fisiopatología cardiaca y el desarrollo de hipertrofia cardiaca. En cardiomiocitos, parece haber una expresión constitutiva de COX-1, mientras que la expresión de COX-2, ausente en el miocardio sano, se encuentra inducida en respuesta a isquemia y tras infarto de miocardio (Abbate et al, 2004; Shinmura et al, 2000; Wong et al, 1998). Estímulos inflamatorios como la IL-1 β , el TNF α y el LPS son también capaces de inducir la expresión de COX-2 y la mPGES-1 en cardiomiocitos (Degousee et al, 2006; Degousee et al, 2003; Giannico et al, 2005; Grandel et al, 2000; Liu et al, 1996; Peng et al, 2005). La expresión

de COX-2 también se ha visto incrementada en el corazón de pacientes con cardiopatía dilatada (Wong et al, 1998).

En modelos de hipertrofia inducida por sobrecarga de presión, los ratones carentes del receptor IP de la PGI₂ desarrollan hipertrofia cardiaca en mayor grado que los ratones silvestres (Hara et al, 2005). Otros trabajos muestran que, aunque la PGI₂ no muestra efectos anti-hipertróficos directos sobre cardiomiocitos en cultivo (Adams et al, 1996; Ritchie et al, 1998), sí es capaz de atenuar la hipertrofia cuando los cardiomiocitos se cocultivan con otros tipos celulares cardiacos, sugiriendo que la PGI₂ inhibe el desarrollo de hipertrofia al inhibir la liberación de factores pro-hipertróficos procedentes de estas células cardiacas no miocíticas (Hara et al, 2005). Además, se ha descrito que, ante una situación de fallo cardiaco, tanto la expresión de COX-2 (Wong et al, 1998), como la síntesis de PGI₂ se encuentran elevadas en el corazón (Newman et al, 1983).

Por su parte, la síntesis de PGE₂ también se encuentra elevada en el corazón hipertrofiado (Zamorano & Carmona, 1992). Esta prostaglandina se ha visto involucrada en el fenómeno de hipertrofia cardiaca, modulando la síntesis de proteínas y el crecimiento de los cardiomiocitos a través de la unión a su receptor de membrana EP4 (Mendez & LaPointe, 2005). La señalización a través del EP4 en cardiomiocitos involucra en parte a proteínas como Stat3, PKA, Rap, ERK1/2 o p90RSK (Frias et al, 2007; He et al, 2010; Schaub & Hefti, 2007) y resulta en un incremento del área celular, en una mayor síntesis proteica y en la expresión de los genes marcadores ANP y BNP (He et al, 2010; Mendez & LaPointe, 2005; Qian et al, 2006).

La PGF_{2α} se libera en el corazón de ratas sometidas a infarto de miocardio (Lai et al, 1996), en cardiomiocitos sometidos a hipoxia *in vitro* (Oudot et al, 1995) o en fibroblastos cardiacos (Wang et al, 2009; Zhang et al, 2010). Las acciones descritas para esta prostaglandina en corazón proceden principalmente de estudios llevados a cabo en ratas, donde se ha visto que la administración exógena de esta prostaglandina es capaz de inducir hipertrofia *in vitro* en cardiomiocitos ventriculares tanto de ratas neonatas (Adams et al, 1996; Kunapuli et al, 1998; Lai et al, 1996) como adultas (Lai et al, 1996; Ponicke et al, 2000). También se han descrito los efectos de la administración crónica de análogos de la PGF_{2α} como el Fluprostenol en el crecimiento cardiaco *in vivo* (Lai et al, 1996). Estos efectos parecen estar mediados por el receptor FP (Adams et al, 1996; Ponicke et al, 2000).

OBJETIVOS

Los objetivos planteados en esta tesis doctoral tienen su base, por un lado, en antecedentes que ponen de manifiesto que la $\text{PGF}_{2\alpha}$ es capaz de inducir la activación del factor de transcripción NFAT en músculo, además de resultados de nuestro grupo que muestran el papel de esta prostaglandina en la regulación de la expresión génica en linfocitos T. Por otro lado, si bien es conocido que ciertos prostanoides como la $\text{PGF}_{2\alpha}$ son capaces de inducir hipertrofia en cardiomiocitos in vitro y que la vía de señalización Calcineurina/NFAT juega un papel relevante en hipertrofia cardíaca, no existen evidencias que relacionen estas observaciones.

En base a estos antecedentes, los objetivos propuestos en esta tesis doctoral han sido los siguientes:

1. Estudiar el mecanismo de acción por el cual la prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$ regula la expresión génica en linfocitos T, analizando la implicación de la vía de señalización de Ca^{2+} /Calcineurina/NFAT.
2. Analizar los efectos de la prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$ sobre la expresión génica en cardiomiocitos, estudiando la relación entre sus efectos sobre la inducción de hipertrofia cardíaca y la activación de la vía de señalización de Ca^{2+} /Calcineurina/NFAT.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales

1.1. Líneas celulares

La línea celular linfoblástica T humana Jurkat se cultivó en medio RPMI 1640 complementado con 5% de suero de ternera fetal (FCS; BioWhitaker). La línea celular H9c2 de mioblastos cardiacos de rata (ATCC® Number CRL-1446™) se mantuvo en crecimiento en medio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) suplementado con un 10% de FCS. Las células se cultivaron a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% con un 97% de humedad relativa. Los medios de cultivo fueron suplementados con 0,1 mM de aminoácidos no esenciales, 2 mM de L-glutamina (Sigma) y una mezcla de antibióticos (100 µg/ml estreptomina, 100 U/ml penicilina, 1000 U/ml gentamicina).

1.2. Cultivos primarios

Los cardiomiocitos primarios se aislaron a partir de crías neonatas (2-3 días de edad) de ratas Wistar (*Harlan Laboratories*). Tras la anestesia de los neonatos con Isoflurano, se procedió a la extracción quirúrgica de los corazones, descartando las aurículas. Los ventrículos fueron lavados con medio HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*) libre de Ca²⁺ y Mg²⁺ y se trocearon con un bisturí antes de ser digeridos con un coctel enzimático que contenía colagenasa tipo IV (200 U/ml, de Sigma), colagenasa tipo I (0,025 mg/ml, de Sigma), tripsina 1x (Sigma) y DNasa I (0,2 U/ml, Sigma). Se realizaron 5 digestiones seriadas de 15 minutos a 37°C en agitación suave. Los cardiomiocitos extraídos se sembraron en frascos de cultivo con DMEM 5% FCS por un periodo de dos horas que permitió la separación de los fibroblastos cardiacos que quedaron adheridos al plástico. Las células no adheridas, principalmente cardiomiocitos, se sembraron en placas pre-tratadas con gelatina 1% (Sigma) en medio DMEM suplementado con 10% FCS y 5% de suero de caballo (HS) además de 0,1 mM de aminoácidos no esenciales, 2 mM de L-glutamina (Sigma) y mezcla de antibióticos (100 µg/ml estreptomina, 100 U/ml penicilina, 1000 U/ml gentamicina). Las células se incubaron con bromodeoxiuridina 0,1 mM (Sigma) para eliminar las células en proliferación distintas a cardiomiocitos, esencialmente fibroblastos.

Los animales estuvieron estabulados en el animalario del CBMSO, con nº de registro 28079-19A, el cual cuenta con un nivel de contención y bioseguridad adecuado de acuerdo a la legislación vigente. Los procedimientos realizados han contado con el visto bueno del responsable de bienestar animal del CBMSO y la aprobación del comité de ética para la investigación de la Universidad Autónoma de Madrid (CEI-27-656). El investigador responsable del proyecto y director de la tesis doctoral, Dr. Miguel A. Iñiguez Peña, dispone de la certificación oportuna para la experimentación animal en las categorías B y C. En cuanto a la doctoranda, también cuenta con experiencia en manipulación de animales, disponiendo de la acreditación para el manejo de animales (categoría B).

1.3. Reactivos

Nombre	Características (Referencia)	Origen
<i>Absolutely RNA Miniprep Kit</i>	Kit de extracción de ARN (400800)	Agilent Technologies
<i>Amaxa Cell Line Nucleofector Kit L</i>	Nucleofección de H9c2 (VCA-1005)	Lonza
<i>Amaxa Rat Cardiomyocyte - Neonatal Nucleofector Kit</i>	Nucleofección de cardiomiocitos (VPE-1002)	Lonza
BSA	Albúmina de suero bovino (A7906)	Sigma-Aldrich
Colagenasa tipo I	Metaloproteinasa de matriz. Degrada tejido conectivo (C5894)	Sigma-Aldrich
Colagenasa tipo IV	Metaloproteinasa de matriz. Degrada tejido conectivo (C1889)	Sigma-Aldrich
CsA	Ciclosporina A. Inhibidor de la Calcineurina (239835)	Calbiochem
Faloidina TRITC	Micotoxina acoplada a TRITC (Tetramethyl-Rhodamine-Iso-Thio-Cyanate) - (P1951)	Sigma-Aldrich
Fluo-3AM	Indicador fluorescente de calcio intracelular (F1242)	Invitrogen
Fluprostenol	Agonista del receptor FP (16768)	Cayman Chemical
Fura-2	Indicador fluorescente de calcio intracelular (F1201)	Invitrogen
Gelatina	Pretratamiento de placas de cultivo de cardiomiocitos (G2500)	Sigma-Aldrich
Higromicina B	Antibiótico de selección (10 843 555 001)	Roche
Ionóforo (Io)	Ionóforo de Calcio A23187 (C7522)	Sigma-Aldrich
Ionomicina (Iom)	Ionóforo de Calcio (I0634)	Sigma-Aldrich
Isoflurano	Anestesia de neonatos de rata (880393.4)	Abbott
Lipofectamina 2000	Reactivo de transfección (11668-019)	Invitrogen
<i>Luciferase Cell Culture Lysis 5x Reagent</i>	Tampón de lisis comercial usado en el ensayo de actividad luciferasa (E1531)	Promega
<i>Luciferase Assay System</i>	Sustrato usado en el ensayo de actividad luciferasa (E1501)	Promega
OptiMEM	Medio de cultivo definido usado en transfección (31985047)	Invitrogen
PGE ₂	Prostaglandina E ₂ (14010)	Cayman Chemical
PGF _{2α}	Prostaglandina F _{2α} (16010)	Cayman Chemical
PGF _{2α} EIA kit	Kit de medición de PGF _{2α} (516011)	Cayman Chemical
<i>Super Signal West Dura Substrate</i>	Sustrato quimioluminiscente. Western Blot (34076)	Thermo Scientific
TPA (PMA)	Phorbol 12-myristate 13-acetate. Activador de la PKC (P-1585)	Sigma-Aldrich
Tripsina 10x	Peptidasa (15090-046)	Gibco
Tritón X-100	Surfactante no iónico (9002-93-1)	Sigma-Aldrich

1.4. Anticuerpos

Nombre	Características-Aplicación (Referencia)	Origen
Anti α -actina sarcomérica	Monoclonal - Inmunofluorescencia (ab28052)	Abcam
Anti β -actina	Policlonal - Western Blot (sc-1616)	Santa Cruz Biotechnology
Anti IgG de conejo acoplado al fluoróforo Alexa 488	Anticuerpo secundario - Inmunofluorescencia (A21206)	Invitrogen
Anti IgG de conejo acoplado al fluoróforo Alexa 555	Anticuerpo secundario - Inmunofluorescencia (A31572)	Invitrogen
Anti IgG de ratón acoplado al fluoróforo Alexa 488	Anticuerpo secundario - Inmunofluorescencia (A21202)	Invitrogen
Anti-goat IgG-Peroxidasa	Policlonal - Western Blot (A5420)	Sigma-Aldrich
Anti COX-2	Monoclonal - Western Blot (610203)	BD Transduction Laboratories TM
Anti DSCR1 (C-terminal) (RCAN-1)	Policlonal - Western Blot (D6694)	Sigma-Aldrich
Anti ERK 1/2 (C-16)	Policlonal - Western Blot (sc-93)	Santa Cruz Biotechnology
Anti HA-probe (Y-11)	Policlonal - Inmunofluorescencia (sc-805)	Santa Cruz Biotechnology
Anti HSP90 α/β (H-114)	Policlonal - Western Blot (sc-7947)	Santa Cruz Biotechnology
Anti JNK1/3 (C-17)	Policlonal - Western Blot (sc-474)	Santa Cruz Biotechnology
Anti NFATc3 (M-75)	Policlonal - Western Blot e Inmunofluorescencia (sc-8321)	Santa Cruz Biotechnology
Anti NFATc4 (H-74)	Policlonal - Western Blot e Inmunofluorescencia (sc-13036)	Santa Cruz Biotechnology
Anti p-JNK (G-7)	Monoclonal - Western Blot (sc-6254)	Santa Cruz Biotechnology
Anti Phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2)	Policlonal - Western Blot (9101)	Cell Signaling
Anti Receptor FP	Policlonal - Western Blot (101802)	Cayman Chemical

1.5. Sondas para RT-PCR cuantitativa

Nombre	Referencia	Origen
ANP	Rn 00561661_m1	Applied Biosystems
BNP	Rn 00580641_m1	Applied Biosystems
COX-2	Rn 01483828_m1	Applied Biosystems
Myh7 (β -MHC)	Rn 00568328_m1	Applied Biosystems
RCAN-1	Rn 00596606_m1	Applied Biosystems
18S	4308329	Applied Biosystems

1.6. Sondas para RT-PCR convencional

Gen	Oligonucleótido (5'→3')	Tamaño (pb)	Gene ID	Temperatura de anillamiento y ciclos	
18S	Sense: TCAAGAACGAAAGTCGGAGG	489	X01117.1	55°C	25 ciclos
	Asense: GGACATCTAAGGGCATCACAG				
Nfatc1 (NFAT2)	Sense: CAACGCCCTGACCACAGATAG	392	XM_001058445.2	55°C	30 ciclos
	Asense: GGCTGCCTTCCGTCTCATAGT				
Nfatc2 (NFAT1)	Sense: ACATCCGGGTGCCCCGTGAAAGT	679	NM_001107805.1	55°C	30 ciclos
	Asense: CTCGGGGCAGTCTGTTGTTGGATG				
Nfatc3 (NFAT4)	Sense: CTA CTGGTGCCATCCTGTTGT	421	NM_001108447.1	55°C	30 ciclos
	Asense: AGCTCTTGAGCAGATCGCTGAG				
Nfatc4 (NFAT3)	Sense: AACATGGCTGCCAACATTGA	427	NM_001107264.1	55°C	30 ciclos
	Asense: CCCGCTTGTTGCTGTACTCA				
Ptgfr (receptor FP)	Sense: GCTTCGATCAATCGAACATCC	661	NM_013115.1	60°C	30 ciclos
	Asense: CTGGCAAGCTTGACAGTTCC				

1.7. Plásmidos

1.7.1. Plásmidos indicadores (luciferasa)

- pBNP-luc: Contiene dos copias en tándem de una secuencia (5'-CGCGTCTATCCTTTTGTTCATCCTG-3') derivada del promotor de BNP que une NFATc4 (Ichida & Finkel, 2001; Molquentin et al, 1998), clonada en el vector pGL2-*Basic* (Addgene #24956).
- pCOX2-luc (p2-1906): Región de -1796 a +104 del gen humano de COX-2 clonada en el plásmido pXP2-luc (Iniguez et al, 2000).
- pCOX2-luc (p2-275): Región de -170 a +104 del gen humano de COX-2 clonada en el plásmido pXP2-luc (Iniguez et al, 2000).
- pCOX2-luc (p2-150): Región de -46 a +104 del gen humano de COX2 clonada en el plásmido pXP2-luc (Iniguez et al, 2000).
- pIL2-luc: Incluye la región de -326 a +45 del gen humano de la IL-2 clonada en el plásmido pSV2CLUCneo (Durand et al, 1988). Cedido por el Dr. G. R. Crabtree (Universidad de Stanford, Estados Unidos).
- pIL13-luc: Contiene la región de -940 a +48 del promotor del gen humano de la IL-13 clonada en un vector pGL2-*Basic* (Dolganov et al, 1996). Cedido por el Dr. J. Aramburu (Universidad Pompeu Fabra, Barcelona).
- pNFAT-luc: Incluye 3 copias en tándem de la secuencia correspondiente al sitio distal

de unión de NFAT al promotor de IL-2 (elemento ARRE2) fusionado al promotor mínimo (-72/+47) del gen de IL-2 humano (Durand et al, 1988). Cedido por el Dr. G. R. Crabtree (Universidad de Stanford, Estados Unidos).

- (-1664/+83)RCAN1-luc: Región de -1664 a +83 del gen humano de RCAN1 (Cano et al, 2005; Minami et al, 2004).
- (-350/+83)RCAN1-luc: Región de -350 a +83 del gen humano de RCAN1 (Cano et al, 2005; Minami et al, 2004).
- 638ANF-luc: Fragmento del promotor del gen de rata ANF (*Atrial Natriuretic Factor*) clonado en el vector pSVOAL Δ5' (Knowlton et al, 1991). Cedido por la Dra. Youngsook Lee (Universidad de Wisconsin, Estados Unidos).

1.7.2. Plásmidos de expresión

- pcDNA3: Vector de clonaje para expresión de proteínas en eucariotas bajo la regulación del promotor de CMV (Invitrogen).
- pcDNA3.1 Gαq: Plásmido de expresión de la proteína heterotrimérica Gαq de ratón. Cedido por la Dra. Anna Aragay (IBMB, España) (Johansson et al, 2005).
- pEGFP-NFATc4: Plásmido de expresión que codifica para la proteína de fusión comprendida por la proteína EGFP (*Enhanced Green Fluorescence Protein*) y el factor de transcripción NFATc4 (Ichida & Finkel, 2001). (Addgene #10961).
- pEP1: Plásmido de expresión del receptor 1 de la prostaglandina E de rata. (OriGene #RN204660).
- pEP4: Plásmido de expresión del receptor 4 de la prostaglandina E de rata. (OriGene #RN206839).
- pGRK2 wt: Plásmido de expresión de la quinasa GRK2 en su forma silvestre clonada en el vector pcDNA3.1 (Benovic et al, 1989). Cedido por el Dr. J. L. Benovic (*The Kimmerl Cancer Center*, Estados Unidos).
- pGRK2 K220R: Plásmido de expresión de la quinasa GRK2 en su forma mutada clonada en el vector pcDNA3.1. La mutación supone un cambio de Lys por Arg en la posición 220 de la proteína, afectando al dominio quinasa de la enzima (Kong et al, 1994). Cedido por el Dr. J. L. Benovic (*The Kimmerl Cancer Center*, Estados Unidos).
- pmaxGFP: Plásmido de expresión de la proteína GFP (*Green Fluorescence Protein*), utilizado como control de transfección en la nucleofección de las células H9c2. Plásmido procedente de Amaxa (*Cell Line Nucleofector Kit L*, de Lonza).

- pNFATc2-HA: Plásmido de expresión de una proteína de fusión que comprende la proteína NFATc2 de ratón unida al epítipo HA (*human influenza hemagglutinin*, secuencia de aminoácidos YPYDVDPYA), clonada en el vector pEF-BOS (Luo et al, 1996).
- pSVL/FLAG hFP R: Plásmido de expresión de hFP-Flag (proteína de fusión entre el epítipo Flag y el receptor FP humano) (Neuschafer-Rube et al, 2003). Cedido por el Dr. F. Neuschäfer-Rube (Universität Potsdam, Alemania).
- pTK-Hyg: Vector de selección que confiere resistencia a higromicina en células de mamífero, usado en la selección de células transfectadas de forma estable (Clontech #PT3082-5).

2. Métodos

2.1. Transfección estable

Las células Jurkat se transfectaron de manera estable con Lipofectamina-Plus siguiendo las indicaciones del fabricante (Invitrogen Life Technologies). Se realizaron cuatro transfecciones independientes en medio libre de suero (OptiMEM, Invitrogen) a una densidad de 10^6 células/ml, con 2 μ l de lipofectamina, 3 μ l de reactivo Plus y 1,25 μ g de ADN total por millón de células (1 μ g de plásmido pSVL/FLAG-hFP-R y 0,25 μ g de plásmido pTK-Hyg). Las células se incubaron durante 4 horas a 37°C tras lo cual se centrifugaron, se resuspendieron en RPMI al 10% de FCS y se incubaron durante 48 horas más a 37°C antes de tratar con el antibiótico de selección higromicina (200 μ g/ml), el cual se mantuvo durante al menos 10 días hasta conseguir células resistentes al mismo. Se obtuvieron diferentes cultivos celulares en los que se analizó la expresión del receptor FP transfectado mediante *RT-PCR* y *Western blot*, con el fin de seleccionar el más idóneo (Jurkat-FP).

2.2. Transfección transitoria

Las células Jurkat se transfectaron transitoriamente con Lipofectamina-Plus siguiendo las indicaciones del fabricante (Invitrogen Life Technologies). La transfección se realizó en medio OptiMEM (Invitrogen) a una densidad de 10^6 células/ml, con 2 μ l de lipofectamina, 3 μ l de reactivo Plus y 1 μ g de ADN total por millón de células (0,5 μ g de plásmido reportero luciferasa y 0,5 μ g de plásmido de expresión o plásmido control pcDNA3). En aquellos puntos no transfectados con plásmido de expresión, la cantidad de ADN total se corrigió con el vector vacío pcDNA3. Las células se incubaron durante 4 horas a 37°C tras lo cual se centrifugaron, se resuspendieron en RPMI 5% y se incubaron durante 18 horas más a 37°C. Tras este tiempo, las células se trataron con los diferentes estímulos durante 4 horas y se lisaron con 50 μ l de tampón de lisis comercial (Promega). Los extractos celulares se analizaron posteriormente en el ensayo de actividad luciferasa.

Las células H9c2 fueron transfectadas transitoriamente con Lipofectamina 2000 siguiendo las indicaciones del fabricante (Invitrogen Life Technologies). Brevemente, las células se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad de 10^5 células por pocillo y se incubaron toda la noche para permitir su adhesión a la placa. Al día siguiente las células se lavaron con PBS 1x atemperado (NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; $\text{PO}_4\text{HNa}_2\cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 8 mM; $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 1,5 mM) para eliminar restos de suero y antibióticos y se transfectaron en medio OptiMEM con 2 μl de lipofectamina 2000 y 1 μg de ADN total por punto (0,5 μg de plásmido reportero luciferasa y 0,5 μg de plásmido de expresión). En aquellos puntos no transfectados con plásmido de expresión, la cantidad de ADN total se corrigió con el vector vacío pcDNA3. Las células se incubaron con la mezcla de ADN-Lipofectamina 2000 durante 4 horas a 37°C. Pasado este tiempo se retiró el OptiMEM, se añadió DMEM 10% y se mantuvieron otras 18 horas a 37°C. Tras este tiempo, las células se trataron con los diferentes estímulos según se indica en las figuras y se lisaron con 60 μl de tampón de lisis comercial (Promega) tras haber lavado previamente con PBS 1x atemperado. Los lisados se centrifugaron para separar los restos celulares del sobrenadante, usado posteriormente en el ensayo de actividad luciferasa.

Para la transfección transitoria de las H9c2 con el plásmido pEGFP-NFATc4 se utilizó el kit de nucleofección “Amaxa Cell Line Nucleofector Kit L” (Lonza), siguiendo las recomendaciones indicadas por el fabricante. Brevemente, las células se resuspendieron en 100 μl de Solución L suplementada a una densidad de $0,4 \times 10^6$ células por punto y se añadieron 2 μg de ADN (pEGFP-NFATc4 ó pmaxGFP). La mezcla se transfirió a una cubeta de nucleofección y, tras el pulso, las células se incubaron con DMEM 10% atemperado a 37°C. Finalizada la nucleofección, las células se repartieron en placas de 24 pocillos sobre cubre-objetos a una densidad de $0,1 \times 10^6$ células por cubre-objeto, y se dejaron recuperando 18 horas en el incubador. Las células se mantuvieron en medio carente de suero durante 24 horas antes de ser tratadas con los diferentes estímulos durante 4 horas, añadiendo la CsA 1 hora antes del resto de tratamientos. A este protocolo de transfección le siguió un protocolo de inmunofluorescencia para detectar la presencia de EGFP-NFATc4 (ver más adelante).

En el caso de los cultivos primarios de cardiomiocitos, éstos fueron transfectados transitoriamente bien con lipofectamina 2000 o con el kit de nucleofección “Amaxa Rat Cardiomyocyte - Neonatal Nucleofector Kit” (Lonza), siguiendo las recomendaciones indicadas por el fabricante. Las células se resuspendieron en 100 μl de “Nucleofector Solution” a una densidad de 2×10^6 células por punto y se añadieron 5 μg de ADN total (2,5 μg de plásmido reportero y 2,5 μg de plásmido de expresión). La mezcla se transfirió a una cubeta de nucleofección y, tras el pulso, las células se incubaron con DMEM 15% atemperado a 37°C. Tras la nucleofección, las células se repartieron a placas de cultivo de 6 pocillos tratadas previamente con gelatina 1% y se dejaron recuperando 18 horas en el incubador. Transcurrido este tiempo, las células fueron tratadas con los diferentes estímulos durante 4 horas, añadiendo la CsA 1 hora antes del resto de tratamientos. Posteriormente las células se lisaron con 50 μl de tampón de lisis comercial (Promega) tras haber sido

lavadas previamente con PBS 1x atemperado. Los lisados se centrifugaron para separar los restos celulares del sobrenadante, usado posteriormente en el ensayo de actividad luciferasa.

2.3. Actividad luciferasa

La obtención de extractos celulares se llevó a cabo mediante el tratamiento con el tampón de lisis comercial *Luciferase Cell Culture Lysis Reagent*, (Promega). La actividad luciferasa se determinó en un luminómetro “*Monolight 2010*” (*Analytical Luminiscence Laboratory*) tras la incubación de 20 µl de extracto celular con el sustrato luciferina (*Luciferase Assay System*, Promega). Los valores de actividad luciferasa obtenidos se normalizaron con respecto a la cantidad total de proteína medida en los lisados celulares mediante un ensayo del ácido bicinconínico (BCA, Pierce). Los resultados se presentan como unidades de luminiscencia relativa (RLUs) ± SD o como Veces de Inducción ($RLU_{muestra}/RLU_{basal}$) ± SD.

2.4. Obtención y análisis del ARN

La extracción del ARN total de las células se llevó a cabo utilizando el kit “*Absolutely RNA Miniprep Kit*” (Agilent Technologies), de acuerdo al protocolo recomendado por el fabricante.

RT-PCR convencional: La obtención de ADNc se realizó por transcripción reversa a partir de 2 µg de ARN total usando la enzima retrotranscriptasa *MuLV Reverse Transcriptase* en presencia de hexámeros aleatorios que actúan de cebadores, inhibidores de RNasas y desoxinucleótidos trifosfato (Roche). Posteriormente, la expresión génica se determinó por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (*AmpliTaq DNA polimerase*, Roche), usando oligonucleótidos cebadores específicos (véase tabla de “Reactivos”). Las muestras de ADNc se amplificaron como sigue: Tras una desnaturalización inicial de 5 minutos a 94°C se programaron, dependiendo del transcrito a amplificar, 25-30 ciclos de 45 segundos de desnaturalización a 94°C, 45 segundos de anillamiento a una temperatura específica para cada cebador y 45 segundos de amplificación a 72°C. Finalmente se realizó una elongación de 10 minutos a 72°C. Los productos de la PCR se visualizaron mediante su separación en geles de agarosa al 1,5% y tinción con bromuro de etidio.

RT-PCR cuantitativa: Para el análisis de la expresión génica mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real, se realizó la transcripción reversa del ARNm utilizando el kit “*High Capacity cDNA Archive Kit*” (Applied Biosystems) y se amplificó usando el kit “*Taqman Universal PCR Master Mix*”, con sondas “*Taqman MGB*” específicas para cada gen (véase tabla “*Sondas para PCR cuantitativa*”), en un aparato de PCR “*ABI PRISM 7900HT*” (Applied Biosystems) en el servicio de genómica del Parque Científico de Madrid. La cuantificación de la expresión de ARNm se realizó comparando el ciclo umbral de expresión ($\Delta\Delta Ct$) de las muestras con respecto al basal, siguiendo las instrucciones del fabricante (SDS 2.1 software, Applied Biosystems). Todas las muestras se ensayaron por triplicado y se normalizaron por la expresión de los genes endógenos 18S, GAPDH o β -actina. Los datos

se representaron en forma de Veces de Inducción \pm SD.

2.5. Obtención y análisis de proteínas

Para la obtención de extractos celulares totales, una vez sometidas a los distintos tratamientos, las células se trataron con tripsina, se lavaron con tampón fosfato salino (PBS) 1x frío y se lisaron en tampón de lisis IGEPAL (50 mM Tris-HCl pH 8; 10 mM EDTA; 150 mM NaCl; 0,1% SDS; 1% IGEPAL) con inhibidores de proteasas (leupeptina, aprotinina y pepstatina a una concentración de 10 μ g/ml y 0,5 mM phenyl-methylsulphonyl fluoride (PMSF)) e inhibidores de fosfatasa (1 mM Na_3VO_4 , 10 mM Na_2MoO_4 y 1 mM NaF). Las células se lisaron durante 30 minutos a 4°C. Posteriormente se centrifugaron y se cuantificó la cantidad total de proteína mediante un ensayo BCA (Pierce). De cada muestra se separaron 30 μ g de proteína a los que se añadió tampón de carga a un volumen equivalente (2% SDS; 10% glicerol; 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8; 5% 2-mercaptoetanol; 0,01% azul de bromofenol), se hirvieron durante 5 minutos y se resolvieron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Estos geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad) en cámara húmeda con Tris-glicina al 20% de metanol. Las membranas se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente en una solución de TBS-T (20 mM Tris HCl pH7,6; 137 mM NaCl y 0,1% Tween 20) con leche desnatada al 5% y se incubaron durante 18 horas a 4°C con el anticuerpo específico diluido en solución de bloqueo. Tras tres lavados con TBS-T, las membranas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario específico conjugado a peroxidasa, diluido en solución de bloqueo. Tras dos lavados con TBS-T y un tercero con TBS (20mM Tris HCl pH7,6; 137 mM NaCl), las membranas se revelaron con el reactivo quimio-luminiscente "Supersignal West Dura Extended Duration Substrate" (Pierce) para identificar las bandas de proteínas reconocidas por el anticuerpo tras su exposición a películas autorradiográficas.

Para la obtención de extractos citosólicos y nucleares, las células se sembraron con DMEM 10% FCS a una densidad de 2×10^6 células en frascos de 75 cm² y se mantuvieron con DMEM 2% FCS durante 18 horas y durante el tiempo de tratamiento de los estímulos (4 horas). Pasado este tiempo, las células se lavaron con PBS 1x y se levantaron con rascador y PBS frío con inhibidores de fosfatasa (1 mM Na_3VO_4 , 10 mM Na_2MoO_4 y 1 mM NaF). A continuación las células se lisaron en tampón A frío (10 mM HEPES pH 7,6; 10 mM KCl; 0,1 mM EDTA; 0,1 mM EGTA más los inhibidores de proteasas y fosfatasa descritos anteriormente) durante 15 minutos a 4°C. Posteriormente se añadió el detergente IGEPAL a una concentración final de 0,6%, se agitó durante 10 segundos y las muestras se centrifugaron a 4°C durante 30 segundos a 13000 rpm en minifuga. El sobrenadante se recuperó como fracción citosólica, mientras que el precipitado, constituido por los núcleos celulares, fue lisado en tampón C frío (20 mM HEPES pH 7,6; 0,4 M NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA más los inhibidores de proteasas y fosfatasa descritos anteriormente). Tras agitación fuerte durante 10 segundos, las muestras se incubaron 30 minutos a 4°C en agitación continua. La fracción nuclear se obtuvo tras la centrifugación de las muestras a 13000 rpm durante 10 minutos y a 4°C. La cuantificación de proteína en ambos extractos

se realizó mediante el método de Bradford (Bio-Rad).

El densitometrado de las bandas obtenidas en las películas autorradiográficas, se llevó a cabo en el densitómetro GS-800 (BioRad) utilizando el programa *Quantity One 1-D Analysis Software* versión 4.6.3 (BioRad).

2.6. Inmunofluorescencia

La translocación al núcleo de NFAT se analizó mediante inmunofluorescencia. Para ello, las células se sembraron sobre cubreobjetos en placas de 24 pocillos. En el caso de los cardiomiocitos, los cubreobjetos fueron tratados previamente con gelatina 1% y transferidos a placas de 24 pocillos sin gelatina. En el caso de las células Jurkat, los cubreobjetos fueron pre-tratados con poli-lisina (50 µg/ml). Las células H9c2 no requirieron de ningún tratamiento previo de la placa de cultivo para su adhesión. Una vez adheridas las células, se añadieron los distintos tratamientos durante 4 horas, añadiendo la CsA 1 hora antes. Transcurrido este tiempo, y tras tres lavados con PBS 1x, las células se fijaron durante 10 minutos con paraformaldehído al 3,7%, se lavaron 5 minutos con etanol al 70% y se permeabilizaron durante 5 minutos con 0,2% Tritón X-100. Posteriormente se eliminó la autofluorescencia de las células mediante la incubación con NH₄Cl (50 mM en PBS, pH 8) durante 10 minutos. Las células se bloquearon con BSA al 2% en PBS durante 30 minutos y posteriormente se incubaron durante 1 hora en cámara húmeda con los anticuerpos primarios específicos diluidos en solución de bloqueo para, tras varios lavados con PBS, incubarse durante 1 hora con los anticuerpos secundarios correspondientes acoplados a fluorocromos o con Faloidina-TRITC en el caso correspondiente. La tinción de los núcleos celulares se realizó incubando las muestras con 4,6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato (DAPI, Calbiochem). Para el montaje de los cubreobjetos con Mowiol (Aldrich), éstos se lavaron previamente con PBS y agua destilada y se deshidrataron con etanol al 70%. Las muestras montadas se dejaron secar durante 18 horas a temperatura ambiente antes de ser guardadas a 4°C. Las imágenes se capturaron en el microscopio de fluorescencia invertido Axiovert200 (Zeiss) acoplado a una cámara ccd monocroma y color SPOT RT Slider (Diagnostic) del servicio de Microscopía Óptica y Confocal del CBMSO.

Para medir la intensidad de fluorescencia dentro del núcleo, las fotos a 16 bits en blanco y negro para cada canal de fluorescencia fueron analizadas con el programa Image J, ajustando un umbral automático en el canal del DAPI para detectar los núcleos y generar partículas "ROI" en las que se analizó la intensidad de fluorescencia presente en el canal correspondiente a la tinción de NFAT.

2.7. Medida de la movilización de calcio

Ensayos de movilización de calcio con Fluo-3 AM: Las células Jurkat (10⁶ células/ml) fueron resuspendidas en medio HBSS suplementado con Ca²⁺ (1 mM) y 0,5 % de BSA e incubadas con la sonda fluorescente de unión a calcio Fluo-3AM (4 µM) durante 30 minutos a 37°C. Tras tres lavados, las células cargadas con la sonda fueron analizadas por citometría de flujo (FACSCalibur, de Becton Dickinson) durante 1 minuto antes de

añadir el estímulo $\text{PGF}_{2\alpha}$ (1 μM) y analizar durante 4 minutos. En último lugar se añadió el ionóforo de calcio A23187 (4 μM) para establecer la máxima cantidad de calcio que podía ser movilizada. Los datos se analizaron utilizando el software FLOWJO.

Ensayos de movilización de calcio con Fura-2: Los cardiomiocitos primarios de ratas neonatas se cultivaron sobre cubreobjetos pre-tratados con gelatina y se incubaron con la sonda Fura-2 (5 μM , Invitrogen) en medio HCSS sin calcio (120 mM NaCl; 0,8 mM MgCl_2 ; 25 mM HEPES; 5,4 mM KCl pH 7,4; Glucosa 15 mM) suplementado con 0,05 % de ácido plurónico F-127 (Invitrogen), durante 30 minutos a 37°C. Después se lavaron e incubaron en medio HCSS con calcio (CaCl_2 2 mM) durante 30 minutos más a 37°C, tras lo cual los cubres se montaron en la cámara de perfusión de un microscopio Zeiss y se analizó la fluorescencia usando longitudes de excitación de 340 y 380 nm y un filtro de emisión a 510 nm con un objetivo Neofluar de 40x/0,75 durante un minuto, y durante 12 minutos tras añadir el estímulo $\text{PGF}_{2\alpha}$ (1 μM). El análisis posterior se llevó a cabo utilizando el software Aquacosmos 2.6. Los cambios en la concentración de calcio intracelular se expresaron como el ratio de la intensidad de fluorescencia a 340 y a 380 nm (F340/F380). Las longitudes de onda de 340 nm y 380 nm se corresponden con las longitudes de excitación de la sonda unida a Ca^{2+} y la sonda libre, respectivamente, de manera que las mediciones se independizan de la cantidad total de sonda disponible en cada célula (sonda *ratiométrica*).

2.8. Medida de prostaglandinas: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

El análisis de la cantidad de Prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$ producida por las células H9c2 se llevó a cabo utilizando sobrenadantes obtenidos en ensayos con ácido araquidónico. Tras el tratamiento con los correspondientes estímulos, las células fueron resuspendidas en medio HBSS con Ca^{2+} , Mg^{2+} y 1 mg/ml de BSA, pH 7,4 e incubadas con ácido araquidónico (30 μM) durante 30 minutos a 37°C. El sobrenadante se utilizó para medir la cantidad de $\text{PGF}_{2\alpha}$ mediante inmuno-ensayos competitivos con kits EIA (Cayman) siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.9. Análisis estadístico

Los datos presentados en el apartado “Resultados” están expresados como la media aritmética \pm la desviación estándar de los resultados obtenidos en los diversos experimentos sobre muestras ensayadas por triplicado. Los datos han sido analizados con el software GraphPad Prism 4.0 mediante el análisis de la varianza (*one-* o *two-way ANOVA*) seguido del test de Bonferroni. También se llevaron a cabo análisis mediante el test de la *t de Student*. Las diferencias se consideraron significativas a partir de $p < 0,05$.

RESULTADOS

1. Acciones de la prostaglandina $\text{PGF}_{2\alpha}$ en linfocitos T

Los linfocitos T juegan un papel importante en el proceso inflamatorio, siendo una de las principales fuentes de moléculas mediadoras como las quimioquinas y las citoquinas, incluyendo interleuquinas (IL), interferones (IFN) y el factor de necrosis tumoral (TNF), entre otras. Entre los mediadores lipídicos producidos en el proceso inflamatorio destacan los eicosanoides, los cuales incluyen a los prostanoïdes (Feldmann et al, 1989; Moulton, 1996). Estos mediadores cobran especial importancia en el desarrollo de enfermedades de etiología muy diversa, tales como la artritis reumatoide (Akaogi et al, 2006), el alzhéimer (Wei et al, 2010), o alteraciones cardiovasculares como la aterosclerosis o la hipertrofia cardiaca (Basu, 2010; Yuhki et al, 2011).

En ensayos previos realizados en nuestro laboratorio se observó que, tras su activación, tanto las células Jurkat como linfocitos T humanos obtenidos de sangre periférica de donantes, producían prostanoïdes entre los que destacaba la $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Cacheiro-Llaguno, 2010). Otras células del sistema inmune, como los macrófagos, también son capaces de producir cantidades relevantes de $\text{PGF}_{2\alpha}$ tras su activación (Lee et al, 2012). Sin embargo, hasta la fecha, no se han descrito en detalle las acciones de esta prostaglandina en el sistema inmune.

Para profundizar en el estudio de los efectos de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ en linfocitos T, se usó la línea celular linfoblástica T Jurkat parental, así como la línea celular Jurkat-FP obtenida mediante transfección estable con un vector de expresión del receptor humano de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ (FP). La presencia del receptor FP, tanto en la línea parental Jurkat, como en las células Jurkat-FP, se determinó mediante *Western blot*. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la presencia del receptor FP en las células Jurkat y su sobre-expresión en las células transfectadas (Figura 1A). Como control de la expresión de FP se utilizaron extractos de útero de rata, tejido que presenta niveles basales de expresión de este receptor FP en condiciones normales.

1.1 Movilización de calcio en respuesta a $\text{PGF}_{2\alpha}$

La $\text{PGF}_{2\alpha}$ media sus acciones biológicas tras su unión al receptor FP. Este receptor pertenece a la familia de receptores de siete dominios transmembrana acoplados a proteínas G (GPCR). El FP se acopla principalmente con la proteína $\text{G}\alpha_q$, activando la fosfolipasa C, la cual promueve la producción de diacilglicerol e inositol-3-fosfato (IP3), llevando este último a la movilización de calcio (Ca^{2+}) intracelular (Milne & Jabbour, 2003). Por ello, en primer lugar, estudiamos la capacidad de inducir la movilización de Ca^{2+} tras el tratamiento con $\text{PGF}_{2\alpha}$ en las líneas celulares Jurkat y Jurkat-FP. En estas células se analizó, mediante citometría de flujo en presencia de la sonda fluorescente indicadora de Ca^{2+} Fluo-3AM, la variación de fluorescencia tras el tratamiento con $\text{PGF}_{2\alpha}$, o con ionóforo de Ca^{2+} A23187 como control. Como se puede observar en la Figura 1B, el tratamiento con $\text{PGF}_{2\alpha}$ produjo un incremento transitorio de la movilización de Ca^{2+} en las células Jurkat que sobre-expresaban el receptor FP.

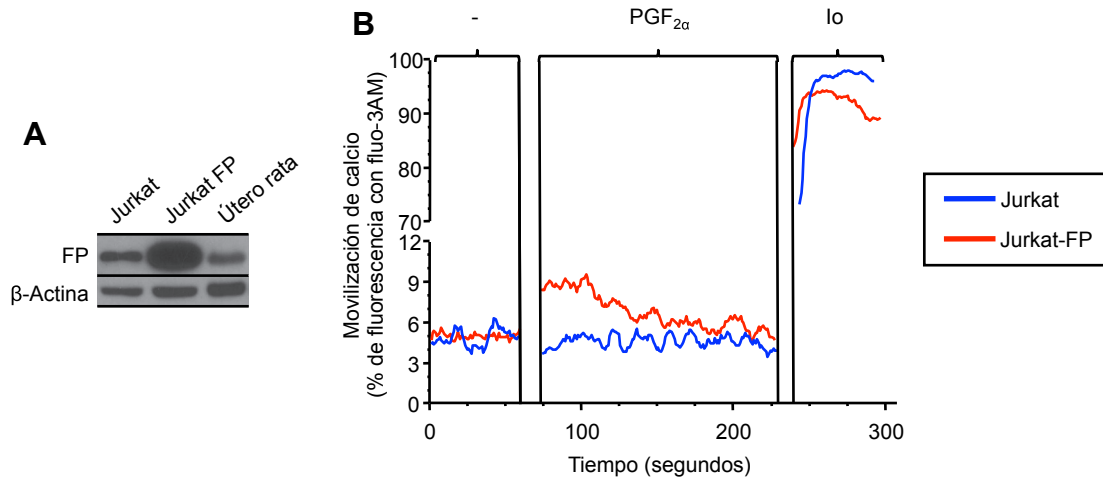


Figura 1. Movilización de Ca^{2+} en células Jurkat. (A) Análisis de la expresión del receptor FP mediante *Western blot* con extractos celulares obtenidos de células Jurkat parentales (Jurkat) o transfectadas establemente con un vector de expresión del receptor FP (Jurkat-FP). Como control de la expresión del receptor FP se usaron extractos obtenidos de útero de rata. Los niveles de expresión de la proteína b-actina se usaron como control de carga. **(B)** Las células Jurkat o Jurkat-FP se incubaron con la sonda fluorescente indicadora de Ca^{2+} Fluo-3AM. Mediante citometría de flujo se analizó el incremento de la fluorescencia en respuesta al tratamiento con $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($1 \mu\text{M}$) a lo largo del tiempo. El ionóforo de Ca^{2+} A23187 ($4 \mu\text{M}$) se añadió en último lugar para establecer la máxima cantidad de calcio movilizable. Los resultados obtenidos se representan como porcentaje de fluorescencia, tomando como 100% la fluorescencia máxima tras la incubación con el ionóforo de calcio A23187, lo que da una medida relativa del porcentaje de calcio movilizado por las células.

1.2. Activación del factor de transcripción NFAT por agonistas del receptor FP

La señal de Ca^{2+} en linfocitos T permite la activación de la calmodulina (CaM), proteína capaz de activar un amplio rango de proteínas citosólicas, entre las que se encuentra la fosfatasa calcineurina. La activación de la calcineurina conduce a su vez a la desfosforilación del factor de transcripción NFAT, lo que deja expuesta una señal de localización nuclear que permite la entrada de este factor al núcleo, donde actuará regulando la expresión de genes diana (Feske et al, 2003; Macian, 2005; Ortega-Perez & Redondo, 2000).

1.2.1. Translocación de NFAT al núcleo

Con el fin de determinar si la $\text{PGF}_{2\alpha}$ era capaz de inducir la translocación del factor del citoplasma al núcleo, las células Jurkat se co-transfectaron con un plásmido que expresa la proteína NFATc2 unida al epítipo HA junto con un vector de expresión vacío (pcDNA3) o con un vector de expresión del receptor FP. Tras la transfección, las células se trataron con $\text{PGF}_{2\alpha}$ o con una combinación del éster de forbol TPA junto con el ionóforo de Ca^{2+} A23187 (TPA+Io), en presencia o ausencia del fármaco inmunosupresor Ciclosporina

A (CsA), durante 4 horas. El tratamiento con TPA+Ionóforo, estímulo farmacológico de activación de linfocitos T que mimetiza la activación de éstos a través del complejo TCR/CD3, usado como control, indujo la translocación de NFATc2 al núcleo tanto en ausencia como en presencia de FP co-transfectado. Como era de esperar, la translocación al núcleo de NFATc2 por TPA+Ionóforo se vio inhibida en presencia de CsA, fármaco inhibidor de la actividad fosfatasa de la calcineurina (Figuras 2 y 3).

Por otro lado, el tratamiento con $\text{PGF}_{2\alpha}$ indujo la translocación de NFATc2 al núcleo de forma similar a lo observado con el tratamiento con TPA+Ionóforo en las células co-transfectadas con el receptor FP (Figura 3), mientras que no lo hizo en las células Jurkat transfectadas con el plásmido control pcDNA3 (Figura 2). El pretratamiento con CsA inhibió la translocación del factor NFATc2 al núcleo mediada por $\text{PGF}_{2\alpha}$ en las células co-transfectadas con el receptor FP (Figura 3).

En conjunto, estos resultados ponen de manifiesto la capacidad de la $\text{PGF}_{2\alpha}$, a través de su unión al receptor FP, de inducir la activación de la ruta de señalización Ca^{2+} /calcineurina, promoviendo la translocación al núcleo de NFAT.

1.2.2. Regulación de la actividad transcripcional mediada por NFAT

Una vez determinada la implicación de $\text{PGF}_{2\alpha}$ en el proceso de activación de NFAT, el siguiente paso fue comprobar su papel en la modulación de la actividad transcripcional mediada por este factor, el cual actúa modulando la expresión génica a través de su unión a elementos de respuesta en el ADN. Para ello, las células Jurkat se transfectaron con el plásmido indicador NFAT-luc, el cual contiene tres copias en tándem de la secuencia correspondiente al sitio distal de unión de NFAT al promotor de IL-2, junto con un vector de expresión del receptor FP, y se trataron con $\text{PGF}_{2\alpha}$ o con el agonista del receptor FP Fluprostenol, en presencia o ausencia de CsA. Como se muestra en la figura 4A, tanto la $\text{PGF}_{2\alpha}$ como el Fluprostenol, fueron capaces de inducir eficientemente la actividad transcripcional mediada por NFAT tras la sobre-expresión del receptor FP. Esta inducción fue inhibida en presencia de CsA.

Los elementos de respuesta a NFAT de la IL-2 contenidos en el plásmido NFAT-luc están formados por sitios compuestos de unión de NFAT y el complejo AP-1 (Rao et al, 1997), siendo necesaria la activación de ambos factores de transcripción para la inducción transcripcional de la construcción NFAT-luc. Con el fin de determinar el efecto de los agonistas FP sobre un elemento de respuesta a NFAT descrito como no dependiente de AP-1, como el presente en el promotor de la interleuquina-13, se realizaron ensayos luciferasa con la construcción IL-13-NFAT-luc (De Boer et al, 1999). El perfil de activación transcripcional mediada por el sitio NFAT de la IL-13 fue similar al obtenido con el sitio NFAT de la IL-2, observándose un incremento en la actividad luciferasa tras el tratamiento con los agonistas $\text{PGF}_{2\alpha}$ o Fluprostenol, en presencia del receptor FP (Figura 4B). El tratamiento previo con CsA consiguió inhibir la inducción de la actividad luciferasa.

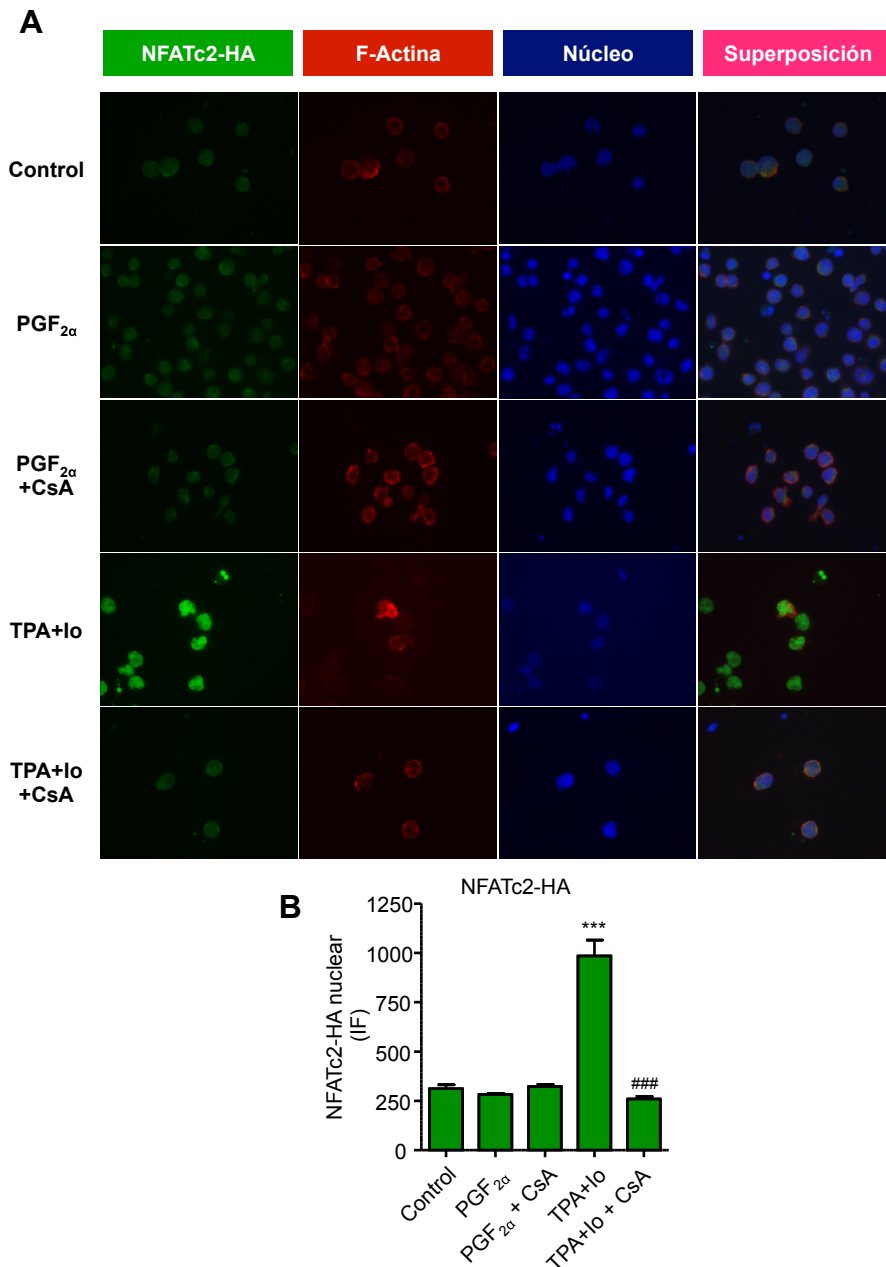


Figura 2. Efecto de la PGF_{2α} sobre la translocación al núcleo de NFATc2 en células Jurkat.

Las células Jurkat se co-transfectaron con el plásmido pNFATc2-HA que expresa la proteína NFATc2 unida al epítipo HA, junto con un vector de expresión vacío pcDNA3. Posteriormente se trataron con PGF_{2α} (1 μM) o TPA + Ionóforo (15 ng/ml + 1 μM) durante 4h, en presencia o ausencia de CsA (100 ng/ml). Las células fueron fijadas y permeabilizadas sobre cubreobjetos. Para la tinción de la proteína NFATc2 transfectada se utilizó un anticuerpo primario anti-HA junto con un anticuerpo secundario anti-IgG acoplado al fluoróforo Alexa 488 (verde). Los filamentos de actina se detectaron usando Faloidina TRITC (rojo). Los núcleos se tiñeron con Dapi (azul). Las imágenes fueron tomadas en un microscopio de fluorescencia invertido Axiovert200 (Zeiss) acoplado a una cámara ccd monocroma y color SPOT RT Slider (Diagnostic). **(A)** Imágenes representativas de un experimento de los 3 realizados por duplicado. **(B)** Análisis de la intensidad de fluorescencia verde dentro del núcleo en al menos 5 fotografías de cada condición usando el programa Image J. *** p<0,001 respecto al control. ### p<0,001 respecto al mismo estímulo en ausencia de CsA. IF: Intensidad de Fluorescencia.

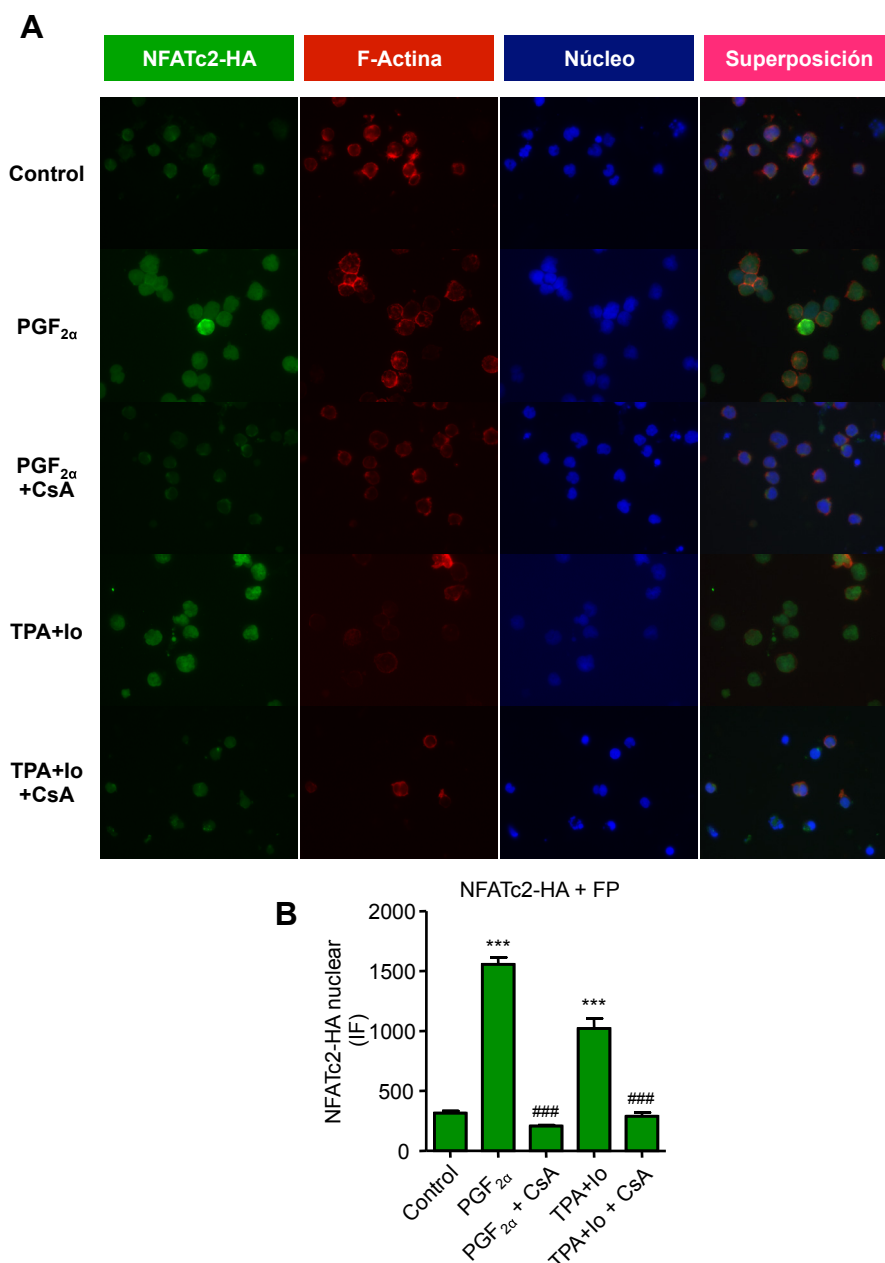


Figura 3. Efecto de la PGF_{2α} sobre la translocación al núcleo de NFATc2 en células Jurkat. Las células Jurkat se co-transfectaron con el plásmido pNFATc2-HA que expresa la proteína NFATc2 unida al epítipo HA, junto con el vector de expresión para el receptor FP, pSVL/Flag-hFP-R. Posteriormente se trataron con PGF_{2α} (1 μM) o TPA + Ionóforo (15 ng/ml + 1 μM) durante 4h, en presencia o ausencia de CsA (100 ng/ml). Las células fueron fijadas y permeabilizadas sobre cubreobjetos. Para la tinción de la proteína NFATc2 transfectada se utilizó un anticuerpo primario anti-HA junto con un anticuerpo secundario anti-IgG acoplado al fluoróforo Alexa 488 (verde). Los filamentos de actina se detectaron usando Faloidina TRITC (rojo). Los núcleos se tiñeron con Dapi (azul). Las imágenes fueron tomadas en un microscopio de fluorescencia invertido Axiovert200 (Zeiss) acoplado a una cámara ccd monocroma y color SPOT RT Slider (Diagnostic). **(A)** Imágenes representativas de un experimento de los 3 realizados por duplicado. **(B)** Análisis de la intensidad de fluorescencia verde dentro del núcleo en al menos 5 fotografías de cada condición usando el programa Image J. *** p<0,001 respecto al control. ### p<0,001 respecto al mismo estímulo en ausencia de CsA. IF: Intensidad de Fluorescencia.

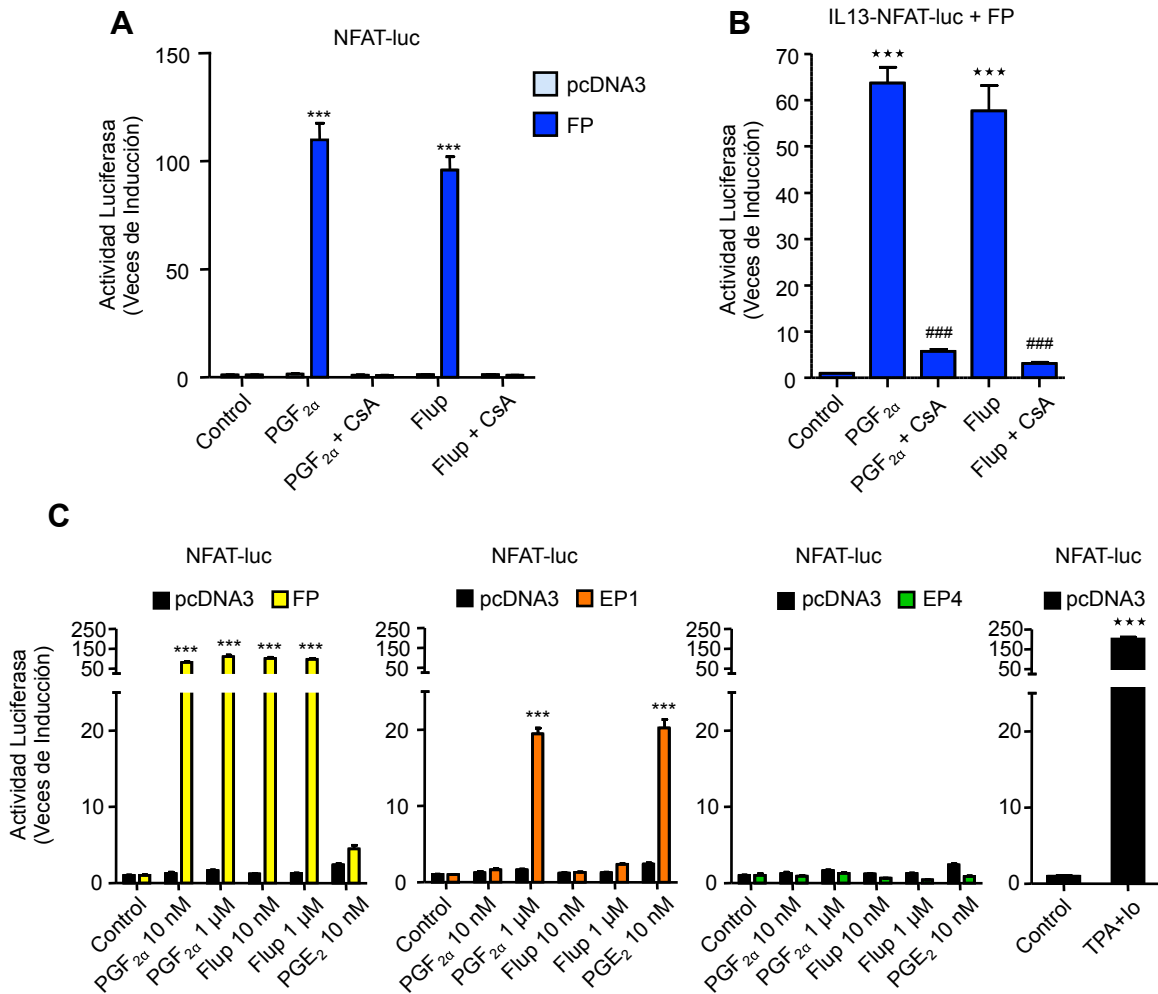


Figura 4. Efecto de los agonistas del receptor FP sobre la activación transcripcional dependiente de NFAT en células Jurkat. Las células Jurkat se cotransfectaron con 0,5 μg del plásmido NFAT-luc (A) o del plásmido IL-13-NFAT-luc (B), junto con 10 ng del plásmido de expresión de FP, pSVL/Flag-hFP-R (FP) o el plásmido vacío pcDNA3 como control. Las células se trataron con CsA (100 ng/ml) desde 1 h antes de estimular con PGF_{2α} o con Fluprostenol (1 μM) durante 4 horas. (C) Las células Jurkat se transfectaron con el plásmido NFAT-luc junto con plásmidos de expresión para los receptores FP, EP1, EP4 o el plásmido pcDNA3. Tras la transfección se trataron con PGF_{2α}, Fluprostenol (10 nM y 1 μM), PGE₂ (10 nM) o TPA + Ionóforo (15 ng/ml + 1 μM) durante 4 horas. La actividad luciferasa obtenida, medida en los lisados celulares, se representa como veces de inducción ($RLU_{muestra}/RLU_{control}$) ± SD (***) p<0,001 con respecto al mismo estímulo sin receptor, ### p<0,001 respecto al mismo estímulo en ausencia de CsA); *** p<0,001 respecto al control).

Debido a las similitudes estructurales existentes entre las prostaglandinas y a que el grado de especificidad de sus receptores los hace a veces permisivos a la hora de reconocer otras prostaglandinas (Ricciotti & FitzGerald, 2011; Yuhki et al, 2011), nos preguntamos si la $\text{PGF}_{2\alpha}$ podría estar regulando la actividad transcripcional de NFAT a través de otros receptores de prostanoides, además del FP. Al igual que el receptor de $\text{PGF}_{2\alpha}$, el receptor EP1 para la PGE_2 señala a través de una proteína $\text{G}\alpha\text{q}$, incrementando los niveles de Ca^{2+} intracelular. En cambio, interaccionando con el receptor EP4, la PGE_2 promueve un incremento de AMPc intracelular al estar acoplado este receptor a proteínas $\text{G}\alpha\text{s}$ (Regan, 2003; Yokoyama et al, 2013). Con el fin de determinar los posibles efectos de $\text{PGF}_{2\alpha}$ sobre la actividad transcripcional de NFAT a través de estos receptores, las células Jurkat fueron co-transfectadas con el plásmido indicador NFAT-luc junto con el plásmido pcDNA3, o con vectores de expresión para los receptores EP1, EP4 o FP, y se trataron con PGE_2 (10 nM) o con distintas dosis de $\text{PGF}_{2\alpha}$ o Fluprostenol (10 nM y 1 μM). Como control de la activación transcripcional de NFAT, las células se trataron con TPA+Ionóforo (Figura 4C). En las células transfectadas con el receptor FP, el tratamiento con los agonistas $\text{PGF}_{2\alpha}$ y Fluprostenol, a cualquiera de las dosis estudiadas produjo un incremento en la actividad transcripcional de NFAT que no tuvo lugar cuando esas mismas células se trataron con PGE_2 . En el caso de las células transfectadas con el receptor EP1, la actividad transcripcional de NFAT fue inducida tanto por PGE_2 (10 nM) como por $\text{PGF}_{2\alpha}$ a la dosis de 1 μM , no observándose diferencias respecto a las células transfectadas con el plásmido vacío pcDNA3 con el tratamiento a dosis más bajas de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (10 nM) o con Fluprostenol a cualquiera de las dosis usadas. Por último, el tratamiento con los estímulos en células transfectadas con el vector de expresión del receptor EP4 no produjo cambios en la actividad transcripcional de NFAT respecto a las células transfectadas con el plásmido control pcDNA3.

1.2.3. Participación de $\text{G}\alpha\text{q}$ en la activación transcripcional dependiente de NFAT a través del receptor FP.

Con el fin de certificar que la subunidad $\text{G}\alpha\text{q}$ juega un papel esencial en la inducción transcripcional de NFAT mediada por la activación del receptor FP, se realizaron ensayos de co-transfección en células Jurkat con el plásmido NFAT-luc combinado con un plásmido de expresión para la proteína $\text{G}\alpha\text{q}$, ya fuera sólo, o junto con el plásmido de expresión del receptor FP. Comprobamos que la sobre-expresión de $\text{G}\alpha\text{q}$ incrementó sustancialmente la activación transcripcional mediada por NFAT en respuesta a $\text{PGF}_{2\alpha}$, siendo este efecto inductor mucho mayor en las células que sobre-expresan el receptor FP. En ambos casos, la inducción observada tras la sobre-expresión de $\text{G}\alpha\text{q}$ fue sensible a CsA (Figura 5A).

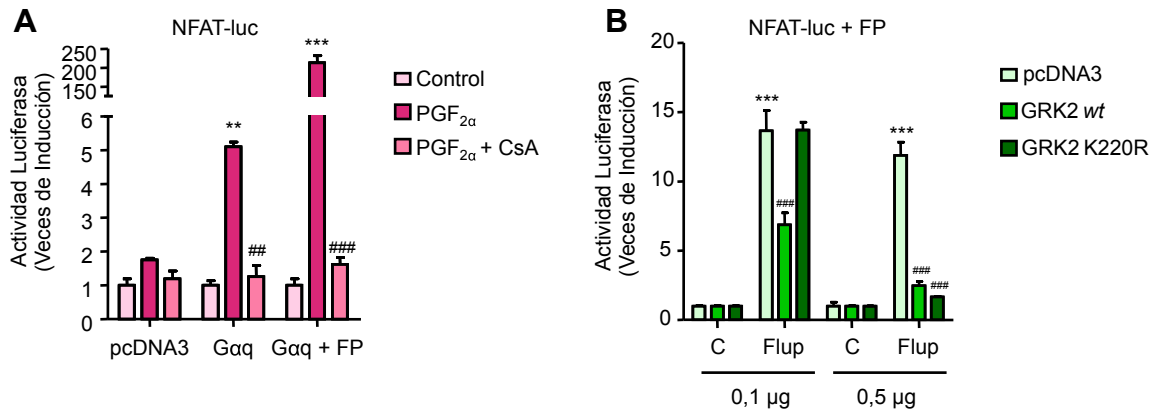


Figura 5. Efectos de la expresión de Gαq o GRK2 sobre la regulación de la activación transcripcional dependiente de NFAT por los agonistas del receptor FP. (A) Las células Jurkat fueron co-transfectadas con el plásmido NFAT-luc junto con el plásmido control pcDNA3 o el plásmido de expresión para Gαq sólo o junto con el plásmido de expresión del receptor FP. Las células se trataron con CsA (100 ng/ml) desde una hora antes de estimular con PGF_{2α} (1 μM) durante 4 horas. La actividad luciferasa está representada como veces de inducción ($RLU_{muestra} / RLU_{control} \pm SD$). (** $p < 0,01$ respecto al control) (### $p < 0,001$; ## $p < 0,01$ respecto al estímulo en ausencia de CsA). **(B)** Las células Jurkat fueron co-transfectadas con el plásmido NFAT-luc junto con el plásmido control pcDNA3 o con distintas cantidades de plásmidos de expresión de las proteínas GRK2 en su versión silvestre (GRK2 *wt*) o su versión mutada (GRK2 K220R), en presencia del plásmido de expresión del receptor FP. Las células se trataron con Fluprostenol (1 μM) durante 4 horas. La actividad luciferasa está representada como veces de inducción ($RLU_{muestra} / RLU_{control} \pm SD$) (** $p < 0,001$ respecto al control). (### $p < 0,001$ respecto al mismo estímulo en ausencia de GRK2 *wt* o GRK2 K220R).

Una evidencia adicional sobre el papel del receptor FP y la proteína Gαq en la regulación del factor NFAT por PGF_{2α} se obtuvo mediante el estudio de la influencia de la quinasa GRK2 (*G protein-coupled receptor kinase*) sobre la actividad transcripcional de NFAT. Las GRKs son proteínas quinasas que regulan el proceso de desensibilización de numerosos receptores acoplados a proteínas G, utilizando mecanismos tanto dependientes como independientes de la fosforilación del receptor (Evron et al, 2012). En el caso de la GRK2, se ha descrito que es capaz de interactuar selectivamente con Gαq interfiriendo en su interacción con receptores y efectores asociados (Sallese et al, 2000). La influencia de GRK2 sobre la inducción de la actividad de NFAT a través de la activación del receptor FP, se analizó mediante la transfección de cantidades crecientes (0,1 o 0,5 μg) de plásmidos de expresión de una versión silvestre (*wt*) de la GRK2 o de una versión mutada de la misma en el dominio quinasa (GRK2 K220R) en células Jurkat que sobre-expresaban el receptor FP. Como se muestra en la figura 5B, la inducción de la actividad transcripcional mediada por NFAT tras el tratamiento con Fluprostenol fue inhibida en presencia de dosis crecientes de GRK2 *wt*. Por otro lado, la sobre-expresión de la GRK2 K220R interfirió negativamente en la activación de NFAT tan sólo a la dosis mayor de plásmido co-transfectado.

1.3. Activación de la transcripción de genes dependientes de NFAT por agonistas del receptor FP

La activación de NFAT, en cooperación con otros factores de transcripción como AP-1, interviene en la regulación de la expresión de una serie de genes involucrados en las funciones del sistema inmune que poseen elementos de respuesta a NFAT en la secuencia de sus regiones promotoras. Entre éstos se encuentran los genes de la interleuquina-2 (IL-2), de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) (Iniguez et al, 2000; Urso et al, 2011), o el gen del regulador de calcineurina RCAN-1 (Rothermel et al, 2003), entre otros.

Con el fin de analizar a nivel transcripcional el efecto de los agonistas del receptor FP sobre la expresión de los genes COX-2, IL-2 y RCAN-1 se co-transfectaron células Jurkat con el vector de expresión del receptor FP junto con plásmidos que contenían el gen indicador luciferasa bajo el control de las regiones promotoras de dichos genes. Las células se trataron durante 4 horas con $\text{PGF}_{2\alpha}$, Fluprostenol o con TPA+Ionóforo, en presencia o ausencia de CsA y se analizó la actividad luciferasa en los lisados celulares. Como se muestra en la figura 6, los tratamientos con los agonistas del FP, $\text{PGF}_{2\alpha}$ y Fluprostenol, al igual que el control con TPA+Ionóforo, promovieron un incremento, en mayor o menor medida, dependiendo del gen en estudio, de la transcripción mediada por los promotores de los tres genes estudiados, COX-2, IL-2 o RCAN-1. El tratamiento previo con CsA produjo una inhibición de dicha inducción.

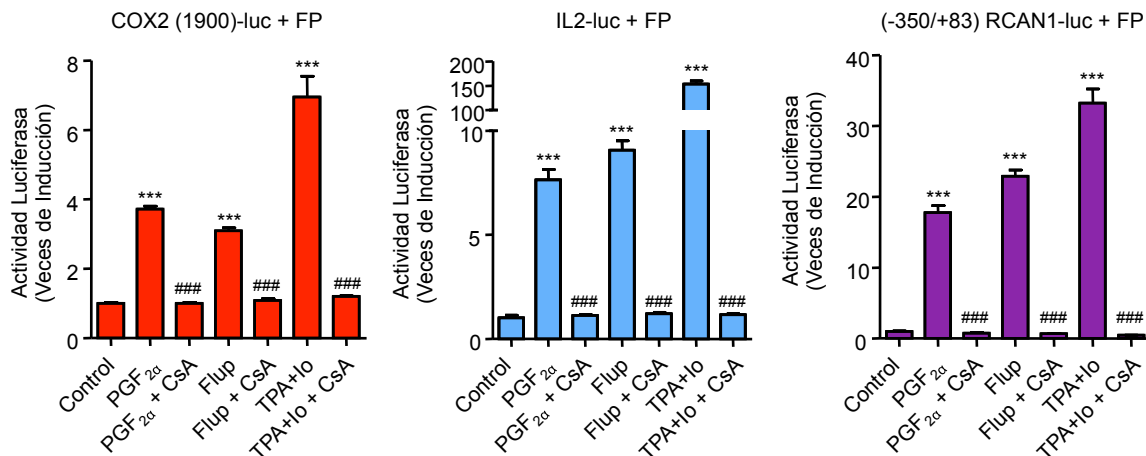


Figura 6. Efecto de los agonistas del receptor FP sobre la activación transcripcional de COX-2, IL-2 y RCAN-1. Las células Jurkat se cotransfectaron con 0,5 μg de los plásmidos COX2-luc, IL2-luc o RCAN1-luc conteniendo secuencias de la región promotora de estos genes, junto con 10 ng del plásmido de expresión de FP, pSVL/FLAG-hFP-R. Las células se pretrataron con CsA (100 ng/ml) 1 h antes de estimular con $\text{PGF}_{2\alpha}$, Fluprostenol (1 μM) o TPA + Ionóforo (15 ng/ml + 1 μM) durante 4 h. La actividad luciferasa, medida en los lisados celulares, está representada como veces de inducción ($\text{RLU}_{\text{muestra}}/\text{RLU}_{\text{control}}$) \pm SD (***) $p < 0,001$ respecto al control. ### $p < 0,001$ respecto al mismo estímulo en ausencia de CsA).

En conclusión, los resultados obtenidos tras el estudio de los efectos de los agonistas del receptor FP en la activación de células T, ponen de manifiesto la implicación de la señalización mediada por este receptor en la activación de NFAT mediada por Ca^{2+} /calcineurina. La activación de NFAT por los agonistas del receptor FP promueve la inducción transcripcional de genes dependientes de este factor implicados en la activación del linfocito T como IL-2, en inflamación como COX-2, o en la propia regulación del factor de transcripción como RCAN-1.

2. Acciones de la prostaglandina $F_{2\alpha}$ en cardiomiocitos

La $PGF_{2\alpha}$ se encuentra asociada a los factores de riesgo que participan en la enfermedad cardiovascular. Así, esta prostaglandina se encuentra elevada en pacientes con diabetes de tipo 2, con obesidad o en fumadores (Basu, 2007). Además, la $PGF_{2\alpha}$ es un potente vaso- y bronco- constrictor debido a sus efectos en la contracción del músculo liso (Basu, 2010) habiéndose descrito además efectos hipertróficos de $PGF_{2\alpha}$ sobre este tipo celular (Fan et al, 2010). Ensayos experimentales han puesto de manifiesto que el infarto, la isquemia y la sobrecarga de presión incrementan la formación de prostaglandinas en el miocardio (Jiang et al, 2005; Karmazyn, 1989). A su vez, la $PGF_{2\alpha}$ se ha visto involucrada en el remodelado cardiaco y vascular generado en la hipertrofia cardiaca (Jiang et al, 2005; Lai et al, 1996).

Por otro lado, la señalización por Ca^{2+} juega un papel crítico en la generación de hipertrofia cardiaca inducida por varios estímulos hipertróficos como la angiotensina II, la fenilefrina, la endotelina I o el estrés mecánico (Molkentin et al, 1998). El incremento de Ca^{2+} intracelular permite la activación de la calmodulina y con ello la activación de varias proteínas como la calcineurina, mediador clave en la hipertrofia cardiaca por su papel en la activación del factor de transcripción NFAT (Molkentin et al, 1998; Schulz & Yutzey, 2004).

En vista de los resultados obtenidos en linfocitos T sobre la implicación de la $PGF_{2\alpha}$ en la activación de NFAT, y a la vista de la importancia tanto de esta prostaglandina como de NFAT en el proceso hipertrófico, nos preguntamos sobre la posible regulación de este factor de transcripción por la $PGF_{2\alpha}$ en células cardiacas.

2.1 Inducción de hipertrofia en cardiomiocitos

En primer lugar, se analizaron los niveles de expresión del receptor FP en células cardiacas. Para ello, se realizaron ensayos de RT-PCR para el estudio de los niveles de ARNm (Figura 7A) y ensayos de *Western blot* para el estudio de los niveles de proteína (Figura 7B), tanto en cardiomiocitos (NRVMs; *neonatal rat ventricular myocytes*) como en fibroblastos cardiacos (NRVFs; *neonatal rat ventricular fibroblasts*) obtenidos de ratas neonatas, así como en la línea celular de mioblastos cardiacos de rata H9c2. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que los mayores niveles de expresión basal del receptor FP tanto a nivel de ARNm como de proteína se presentan en cardiomiocitos. Por su parte, los fibroblastos cardiacos muestran unos niveles de expresión del receptor FP menores, similares a los presentes en tejido de útero de rata. En el caso de las células H9c2 se detectaron niveles basales muy bajos de receptor FP a nivel de proteína. Los niveles de expresión del receptor en los cardiomiocitos nos dan una idea de la posible importancia de la señalización a través del mismo en este tipo celular.

Estudios previos han descrito la capacidad de la $PGF_{2\alpha}$ de promover hipertrofia cardiaca (Adams et al, 1996; Lai et al, 1996). El análisis del efecto no sólo de la $PGF_{2\alpha}$, sino también del agonista del receptor FP, Fluprostenol, sobre el tamaño celular llevado a cabo en nuestros cultivos de cardiomiocitos de ratas neonatas, puso de manifiesto el efecto

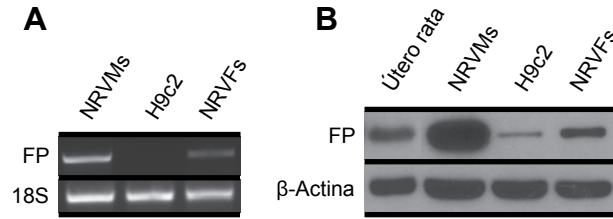


Figura 7. Expresión del receptor FP en células cardiacas. La expresión del receptor FP se determinó mediante RT-PCR (A) y *Western blot* (B) en cardiomiocitos neonatales de rata (NRVMs), fibroblastos cardiacos (NRVFs), además de en la línea celular de mioblastos cardiacos de rata H9c2. Como control de la expresión del receptor FP se usaron extractos obtenidos de útero de rata. Los niveles de expresión endógena del ARNr 18S y de la proteína b-actina se usaron como control de carga.

hipertrófico de estos compuestos, con un incremento en el área celular de los cardiomiocitos (Figura 8A). El análisis del tamaño celular de los cardiomiocitos teñidos con un anticuerpo frente a la α -actina sarcomérica, permitió definir un incremento de 2,6 a 3 veces del área celular media, respecto a los cardiomiocitos controles sin tratamiento (Figura 8B).

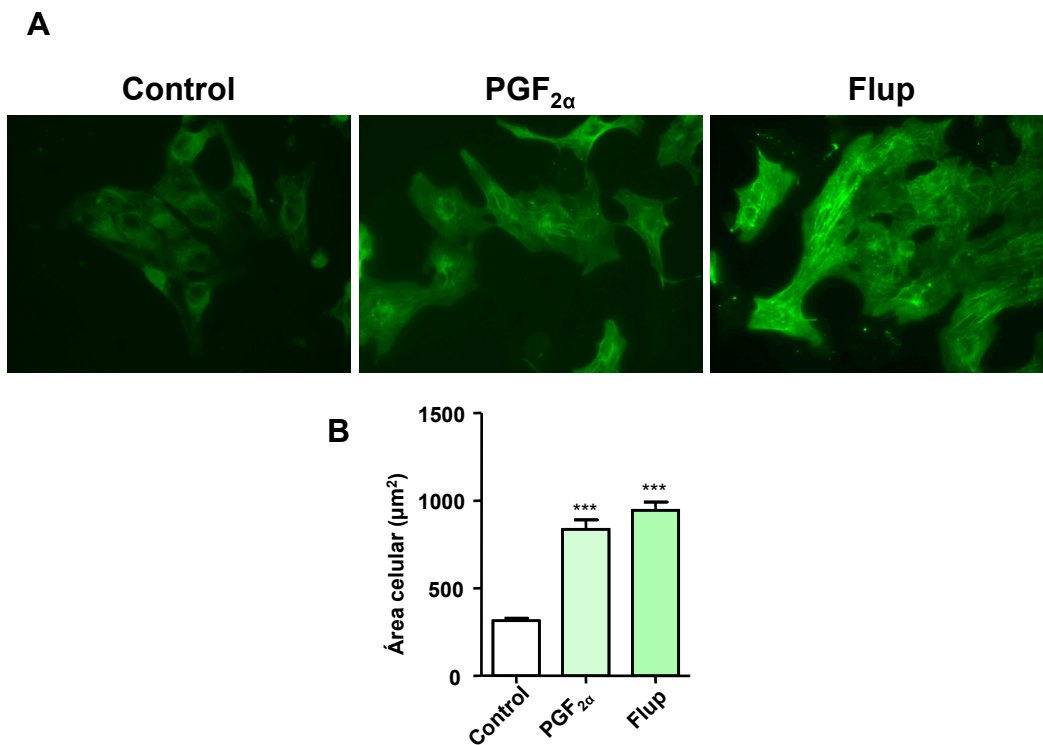


Figura 8. Inducción de hipertrofia en cardiomiocitos tras el tratamiento con agonistas del receptor FP. Los cardiomiocitos neonatales de rata cultivados en presencia o ausencia de PGF_{2α} o Fluprostenol (1 μM) durante 4h, se marcaron con un anticuerpo anti α -actina sarcomérica y se revelaron con un anticuerpo secundario acoplado a Alexa 488. Las imágenes fueron tomadas en un microscopio de fluorescencia. (A) Fotografías representativas de cada condición. (B) Análisis del área celular media obtenido tras el estudio de diferentes campos en dos experimentos independientes. La medida del área celular se realizó con el programa Image J y se muestra como la media del área en μm² ± SD (***) p < 0,001 respecto al control).

2.2. Activación de MAP quinasas por agonistas del receptor FP

La activación por agonistas de los GPCRs (*G protein coupled receptors*) acoplados a la proteína G α q como el receptor FP, promueven la activación de proteínas quinasas C (PKCs) y MAPKs (*mitogen activated protein kinases*) como ERK1/2 (*Extracellular signal-regulated kinases*), p38 y JNK (*c-Jun N-terminal kinases*), además de promover la movilización de Ca $^{2+}$ intracelular. En el corazón se ha descrito que la ruta de señalización de las MAPKs participa en el desarrollo de hipertrofia cardiaca en respuesta a estímulos como los agonistas de receptores acoplados a proteínas G (Choukroun et al, 1998; Glennon et al, 1996; Sugden & Clerk, 1998).

El análisis de la activación de las quinasas ERK1/2 y JNK mediante el estudio de la fosforilación de las mismas tras el tratamiento con los agonistas del receptor FP, PGF $_{2\alpha}$ y Fluprostenol, llevado a cabo en cardiomiocitos primarios de rata, reveló un incremento en la fosforilación de ambas proteínas, con valores máximos a los 10 minutos tras el tratamiento (Figura 9). Estos resultados confirman la implicación de la ruta de las MAPK en la señalización por agonistas del receptor FP en cardiomiocitos.

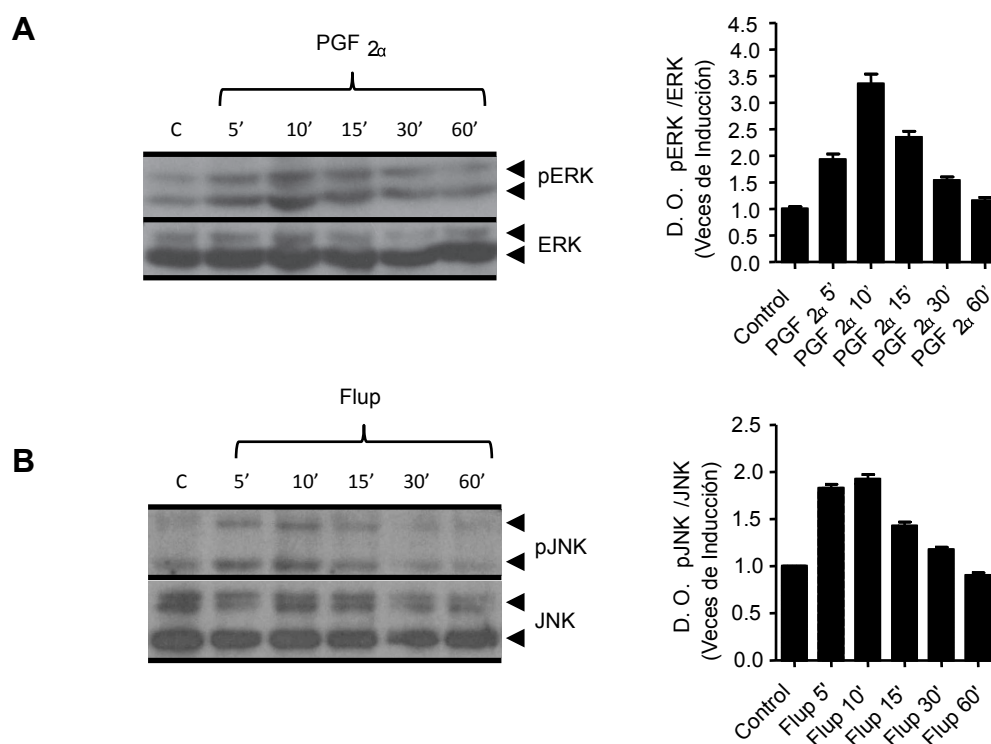


Figura 9. Análisis del efecto de los agonistas del receptor FP sobre la activación de las MAP quinasas ERK y JNK en cardiomiocitos primarios de ratas neonatas. Los cardiomiocitos fueron estimulados con PGF $_{2\alpha}$ o Fluprostenol (1 μ M) durante 5, 10, 15, 30 o 60 minutos. Las figuras muestran *Western blots* representativos del análisis de los niveles de proteína ERK total y ERK fosforilada (p-ERK) (**A**) y de proteína JNK total y JNK fosforilada (p-JNK) (**B**). Las gráficas a la derecha muestran los datos de densidad óptica de las bandas de las formas fosforiladas respecto a las no fosforiladas.

2.3. Movilización de calcio por $\text{PGF}_{2\alpha}$ en cardiomiocitos

Como ya comentamos anteriormente, la señalización por Ca^{2+} juega un papel esencial en el desarrollo de la hipertrofia cardiaca, y muchos de los estímulos hipertróficos conocidos señalizan a través de este segundo mensajero (Molkentin et al, 1998). Ante estos datos, y los obtenidos en linfocitos T, se decidió estudiar la implicación de $\text{PGF}_{2\alpha}$ en la movilización de Ca^{2+} en cardiomiocitos primarios. Para ello, los cardiomiocitos se pusieron en un medio con Ca^{2+} que permitió el llenado de los compartimentos intracelulares tras lo cual fueron incubados con la sonda Fura-2, que emite fluorescencia tanto si se excita a 340 nm (sonda unida a Ca^{2+}) como si se excita a 380 nm (sonda libre). A continuación se analizó la respuesta de las células al tratamiento con $\text{PGF}_{2\alpha}$, determinando la relación de fluorescencias F_{340}/F_{380} como medida de la movilización de Ca^{2+} (Figura 10). Observamos que el tratamiento con $\text{PGF}_{2\alpha}$ promovió un incremento de la movilización de Ca^{2+} de forma gradual. La referencia de los valores máximos de movilización de Ca^{2+} se obtuvo tras el tratamiento posterior con el ionóforo A23187.

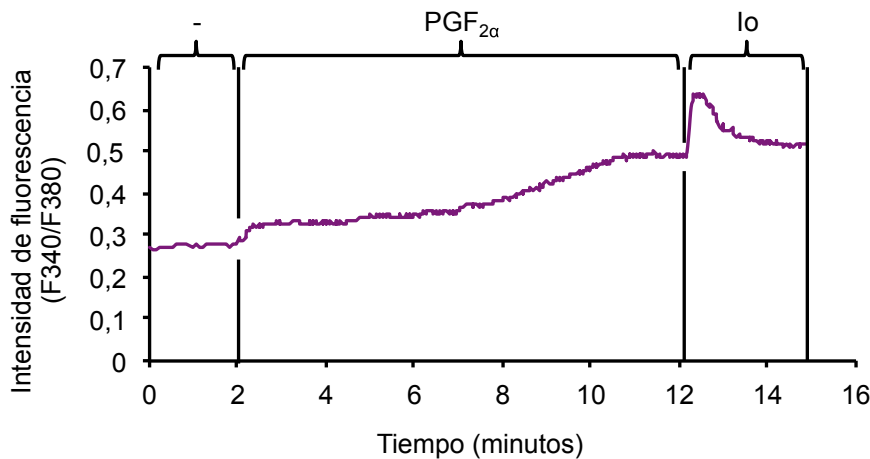


Figura 10. Movilización de Ca^{2+} en cardiomiocitos de ratas neonatas. Los cardiomiocitos se incubaron con la sonda fluorescente Fura-2, analizándose las variaciones de fluorescencia mediante microscopía a lo largo del tiempo de incubación tras el tratamiento con $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($1\mu\text{M}$). La intensidad de fluorescencia se muestra como la relación de los valores de fluorescencia tras la excitación de la sonda a 340 nm (sonda unida a Ca^{2+}) y a 380 nm (sonda libre). El ionóforo de Ca^{2+} A23187 (Io), añadido en último lugar, permite establecer los valores máximos de fluorescencia como referencia.

En conjunto, estos resultados confirman la capacidad de los agonistas del receptor FP de promover la activación de diferentes rutas de transducción como aquéllas determinadas por la activación de MAPKs y la señalización de Ca^{2+} en cultivos de cardiomiocitos de ratas neonatales.

2.4. Activación del factor de transcripción NFAT en células cardiacas

En el proceso de hipertrofia cardiaca se produce la interacción de varias rutas de transducción de señales tales como la ruta de las MAPKs (*mitogen activated protein kinases*), de la fosfoinositol-3-quinasa (PI3K)/Akt, de las proteínas JAK-STAT (*Janus Associated Kinase/Signal Transducers and Activators of Transcription*) o de la Calcineurina/NFAT (Rohini et al, 2010). Son numerosos los estudios que han implicado al Ca^{2+} intracelular como una señal de hipertrofia cardiaca y es conocido que en la señalización del Ca^{2+} cobra especial importancia la calcineurina y el factor de transcripción NFAT (Wilkins & Molkenin, 2004). Este factor de transcripción está considerado como uno de los principales mediadores en la generación de hipertrofia, habiéndose descrito que la activación de NFATc4 en corazón de ratón es suficiente para inducir una hipertrofia cardiaca masiva que resulta en fallo cardíaco congestivo o muerte súbita (Molkenin et al, 1998).

Con el fin de determinar la relación entre la $\text{PGF}_{2\alpha}$ y NFAT en células cardiacas, se llevaron a cabo ensayos tanto en cardiomiocitos primarios de ratas neonatas como en la línea celular H9c2. En primer lugar se analizó la expresión de las distintas isoformas de NFAT mediante ensayos de RT-PCR. Los resultados obtenidos muestran distintos niveles de expresión basal de las diferentes isoformas de NFAT tanto en cardiomiocitos como en fibroblastos cardiacos, con unos niveles mayores de NFATc1 y c3 que de NFATc4. En ambos tipos celulares se observa una expresión basal muy baja de NFATc2. Por otro lado, las células H9c2 expresan principalmente NFATc3 y, en menor medida NFATc4, con bajos niveles de NFATc2 (Figura 11).

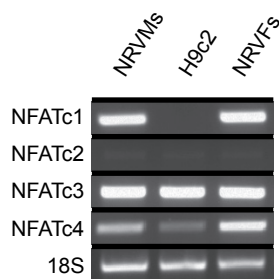


Figura 11. Análisis de la expresión de las isoformas de NFAT en células cardiacas de rata. Los niveles de ARNm de las isoformas NFATc1, c2, c3 y c4 presentes en extractos obtenidos de cardiomiocitos neonatales de rata (NRVMs), fibroblastos cardiacos (NRVFs), además de la línea celular de mioblastos cardiacos de rata H9c2, se analizaron mediante RT-PCR. Los niveles de ARNr 18S se usaron como control de carga.

2.4.1 Efecto de los agonistas del receptor FP sobre la desfosforilación y translocación al núcleo de NFAT

En el proceso de activación de NFAT tiene lugar su desfosforilación por la fosfatasa calcineurina en respuesta a un incremento de los niveles de Ca^{2+} intracelular, lo que determinará su entrada en el núcleo celular. Con el propósito de analizar el efecto del tratamiento con agonistas del receptor FP como la $\text{PGF}_{2\alpha}$ y el Fluprostenol sobre la desfosforilación de NFAT, y por tanto sobre su translocación al núcleo, se analizaron, mediante *Western blot*, las alteraciones en la movilidad de NFATc3 y NFATc4 en extractos de células H9c2 y cardiomiocitos primarios de rata tras el tratamiento con dichos agonistas. En primer lugar se analizaron los efectos de $\text{PGF}_{2\alpha}$ y Fluprostenol tras diferentes tiempos de incubación (de 30 min a 24 h), sobre la desfosforilación de NFAT en células H9c2.

Como se muestra en la figura 12A, tras el tratamiento con ambos agonistas, se observó un aumento gradual en la movilidad de las dos isoformas de NFAT a lo largo del tiempo, como consecuencia de su desfosforilación. Como control se muestra la desfosforilación de ambas isoformas de NFAT promovida por el tratamiento con Ionomicina durante 30 min. Con el fin de comprobar que el aumento de la desfosforilación de NFATc3 y c4 se correspondía con una entrada de dichos factores al núcleo, se analizó la presencia de dichas isoformas mediante ensayos de *Western blot* en extractos citosólicos y nucleares obtenidos de células H9c2 tratadas durante 4 horas con $\text{PGF}_{2\alpha}$, Ionomicina o Ionomicina combinada con TPA, en presencia o ausencia de ciclosporina A (CsA) (Figura 12B). En el caso de NFATc4 se observó una clara presencia del factor en el núcleo cuando las células fueron tratadas con $\text{PGF}_{2\alpha}$, además de con Ionomicina o con TPA+Ionomicina. La inhibición de la actividad fosfatasa de la calcineurina tras el tratamiento con CsA, y por tanto de la desfosforilación de NFAT, impidió la translocación del factor al núcleo. Resultados similares fueron obtenidos para el caso de NFATc3.

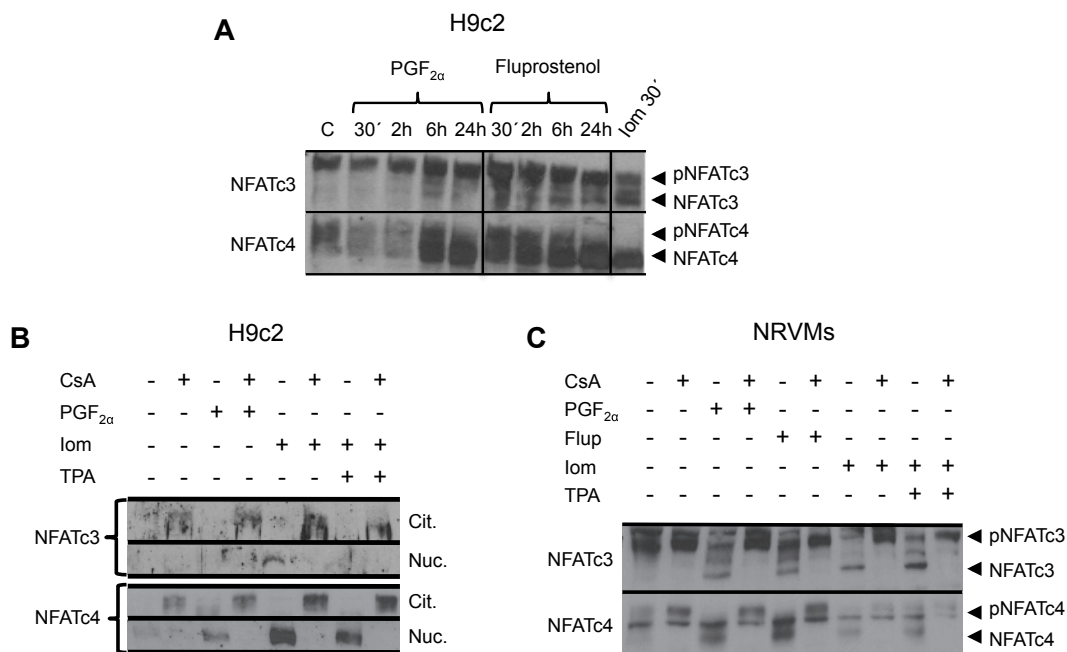


Figura 12. Efecto de los agonistas del FP sobre la fosforilación y translocación al núcleo de NFAT. (A) Extractos totales de células H9c2 tratadas con $\text{PGF}_{2\alpha}$ o Fluprostenol (1 μM) a diferentes tiempos (30 min a 24 h) se resolvieron en geles de SDS-PAGE y la presencia de NFATc3 o NFATc4 fue analizada mediante *Western blot* con anticuerpos específicos. Las flechas indican la diferente movilidad de las formas fosforiladas (p) o desfosforiladas de los NFATs analizados. Como control, se usaron extractos de células tratadas con Ionomicina (Iom; 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 30 min. **(B)** La translocación al núcleo de NFATc3 o NFATc4 se analizó mediante *Western blot* en extractos citosólicos (cit) y nucleares (nuc) de células H9c2 tratadas con $\text{PGF}_{2\alpha}$, Ionomicina o TPA (15 ng/ml) +Iom durante 4 horas, en presencia o ausencia de CsA (100 ng/ml). **(C)** Análisis de la desfosforilación de NFATc3 y NFATc4 en extractos totales de cardiomiocitos de ratas neonatas (NRVMs) tratados con $\text{PGF}_{2\alpha}$, Fluprostenol, Iom o TPA+Iom durante 4 horas, en presencia o ausencia de CsA. En todos los caso, las figuras muestran ensayos de *Western blot* representativos de cada situación experimental.

En cardiomiocitos primarios de ratas neonatales, el tratamiento con agonistas del receptor FP durante 4 horas promovió un incremento de la movilidad electroforética, tanto de NFATc3 como de NFATc4, apareciendo varias bandas con mayor migración en el gel. Estas bandas se corresponderían con proteínas NFATc3 o c4 con distintos grados de desfosforilación. El tratamiento con Ionomicina o TPA+Ionomicina también promovió la desfosforilación de ambas isoformas de NFAT. Por otro lado, la presencia de CsA impidió la desfosforilación de NFAT por cualquiera de los estímulos anteriores, de forma que no se observó la aparición de bandas de mayor movilidad correspondientes a la desfosforilación de NFATc3 o c4 (Figura 12C).

El efecto de los agonistas del receptor FP sobre la translocación de NFAT al núcleo en células cardíacas se confirmó mediante ensayos de inmunofluorescencia. La figura 13A muestra figuras representativas de microscopía de fluorescencia en las que se aprecia el efecto de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ y la Ionomicina sobre la translocación de NFATc4 en células H9c2 transfectadas con un plásmido de expresión de una proteína NFATc4 fusionada a la proteína EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*). Los núcleos celulares se identificaron tras tinción con el reactivo Dapi y los filamentos de actina con Faloidina TRITC. Si bien en menor medida que el tratamiento con Ionomicina, la $\text{PGF}_{2\alpha}$ fue capaz de promover la translocación al núcleo de la proteína NFATc4-EGFP. En ambos casos, dicha translocación fue inhibida en presencia de CsA. La gráfica de la figura 13B muestra la cuantificación de la señal nuclear de NFATc4-EGFP.

El análisis de la translocación de NFATc3 y de NFATc4 endógenos en cardiomiocitos primarios de ratas neonatas (NRVMs) se realizó mediante el marcaje de las células con anticuerpos específicos para estas isoformas de NFAT, así como para la α -actina sarcomérica que permite identificar los cardiomiocitos, además de la tinción de núcleos con Dapi. Tanto las imágenes representativas de microscopía de fluorescencia (Figura 14A), como el análisis de la cantidad de NFATc3 nuclear en diferentes campos (Figura 14B), muestran que, tras el tratamiento tanto con $\text{PGF}_{2\alpha}$ como con Fluprostenol, se observa un aumento de la señal de NFATc3 en el núcleo. El tratamiento previo con CsA consiguió inhibir eficientemente la translocación nuclear del factor. En el caso de NFATc4 los resultados fueron aún más evidentes, con un aumento significativo de la señal nuclear de NFATc4 en presencia de $\text{PGF}_{2\alpha}$ o Fluprostenol. El tratamiento con CsA redujo de forma notable la translocación nuclear de NFATc4 en ambos casos (Figura 15).

En conjunto, estos resultados ponen de manifiesto que la señalización a través del receptor FP por agonistas como la $\text{PGF}_{2\alpha}$ o el Fluprostenol son capaces de promover la desfosforilación de diversas isoformas de NFAT, lo que permite su translocación al núcleo. Estos efectos sobre la activación de NFAT tienen lugar de forma similar a los promovidos por el tratamiento con ionóforos de Ca^{2+} , bien solos o en combinación con TPA. Por su parte, el hecho de que la CsA reduzca los efectos promovidos por estos estímulos, sugiere la participación de la calcineurina.

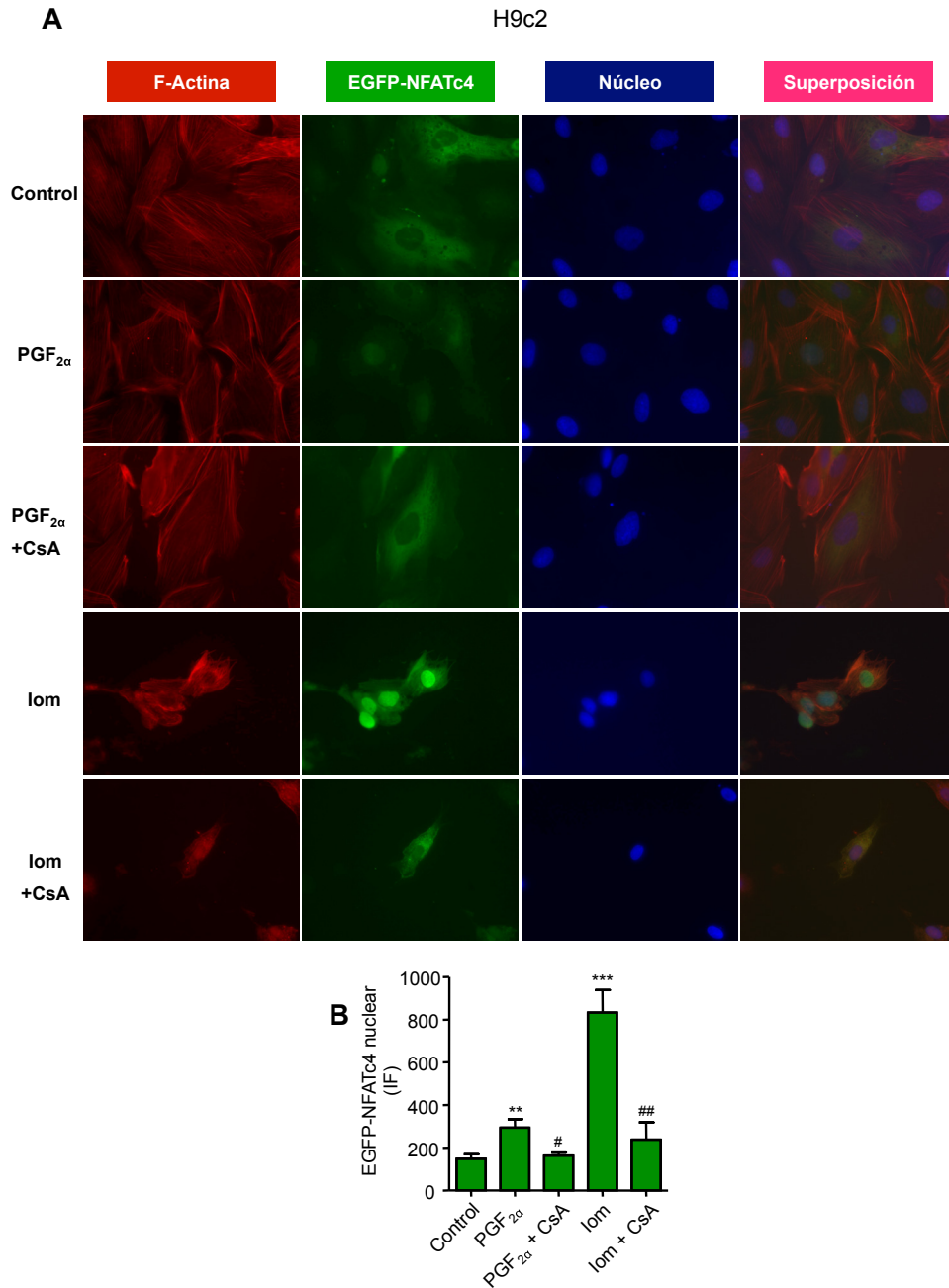


Figura 13. Efecto de los agonistas del FP sobre la translocación al núcleo de NFATc4 en células H9c2. (A) Las células H9c2 se transfectaron con el plásmido de expresión pEGFP-NFATc4 mediante nucleofección. Posteriormente se trataron con CsA (100 ng/ml) durante 1 hora antes de estimular con PGF_{2α} (1 μM) o Ionomicina (lom; 0,5 μg/ml) durante 4 horas. Para la detección de los filamentos de actina se utilizó Faloidina TRITC (rojo). Los núcleos se tiñeron con Dapi (azul). La figura muestra imágenes representativas de cada condición obtenidas mediante microscopía de fluorescencia. (B) Análisis de la intensidad de fluorescencia de GFP-NFATc4 (verde) dentro del núcleo en todas las fotos obtenidas en un experimento realizado por duplicado. Las gráficas muestran los valores de las medias de intensidad de fluorescencia (IF) ± SD. (** p<0,01; *** p<0,001 respecto al control) (# p<0,05; ## p<0,01 respecto al estímulo en ausencia de CsA).

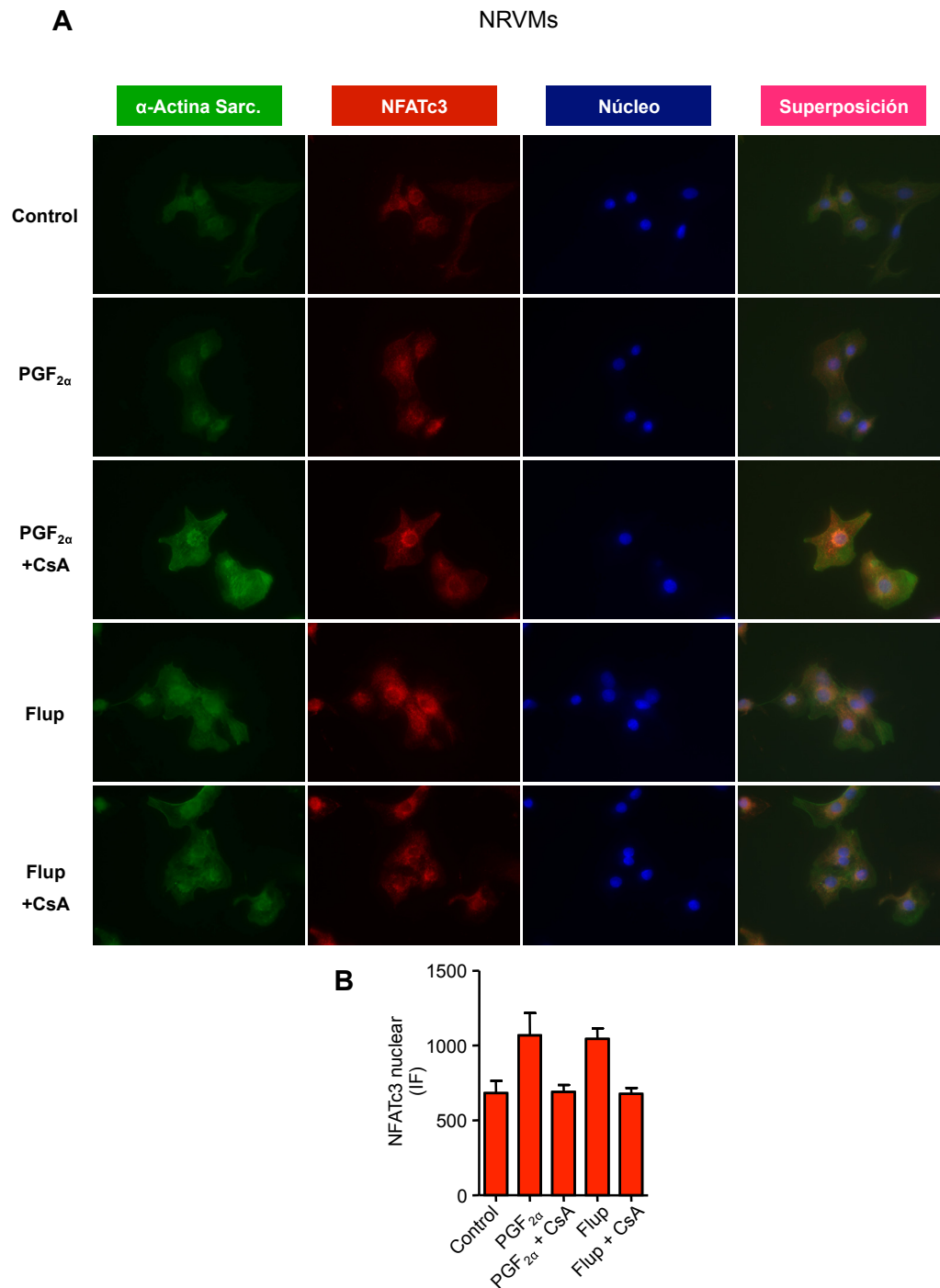


Figura 14. Efecto de los agonistas del FP sobre la translocación al núcleo de NFATc3 en cardiomiocitos de ratas neonatas. (A) Los cardiomiocitos (NRVMs) se trataron con PGF_{2 α} o Fluprostenol (1 μ M) durante 4h, en presencia o ausencia de CsA (100 ng/ml). Las proteínas α -actina sarcomérica y NFATc3 se detectaron con anticuerpos primarios específicos que se revelaron con anticuerpos secundarios acoplados a Alexa 488 (verde) o Alexa 555 (rojo), respectivamente. Los núcleos se tiñeron de azul con Dapi. La figura muestra imágenes representativas obtenidas mediante microscopía de fluorescencia. (B) Análisis de la intensidad de la señal fluorescente roja (NFATc3) dentro del núcleo, en todas las fotos obtenidas en un experimento realizado por duplicado. Las gráficas muestran los valores de las medias de intensidad de fluorescencia (IF) \pm SD.

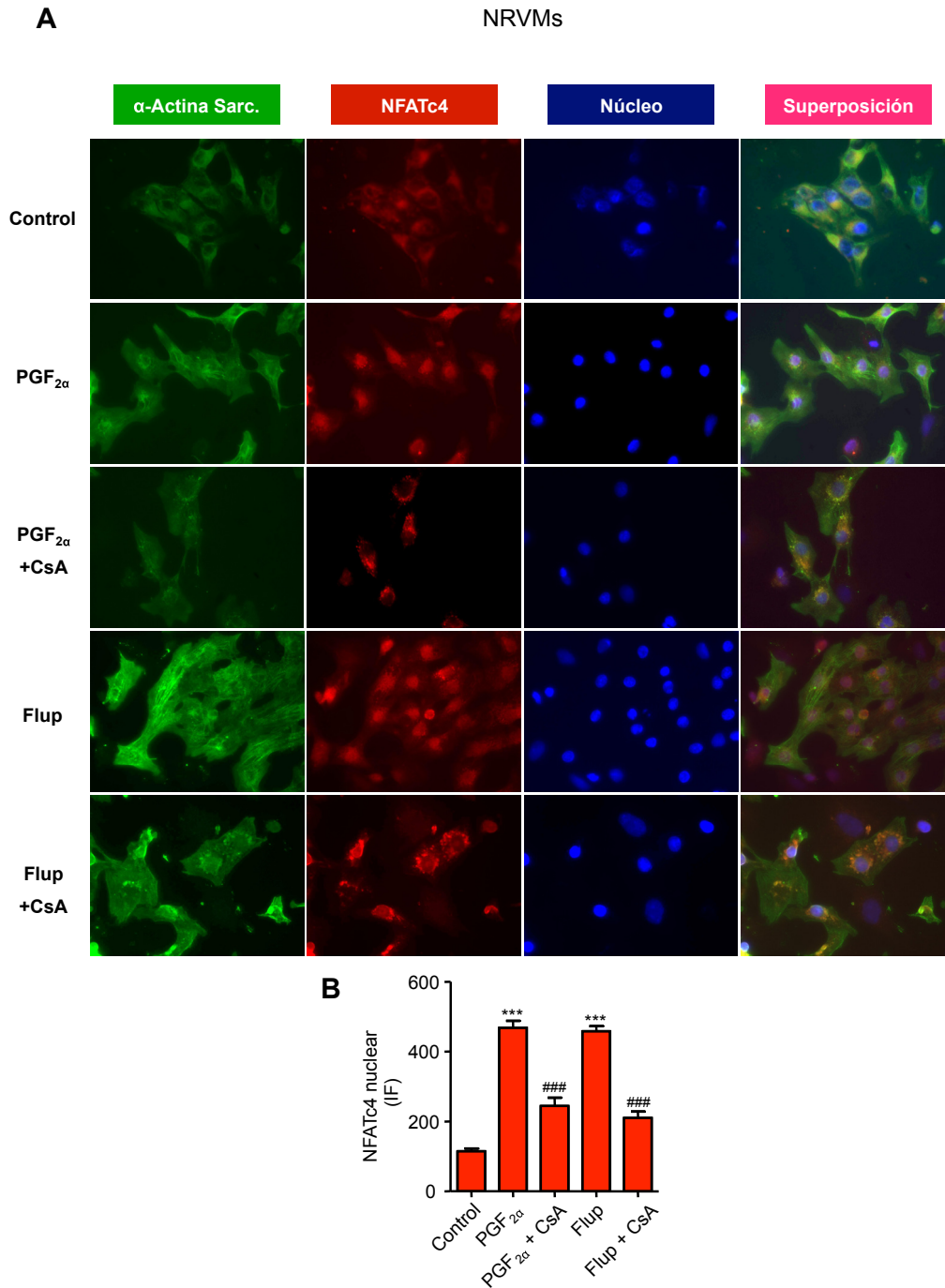


Figura 15. Efecto de los agonistas del FP sobre la translocación al núcleo de NFATc4 en cardiomiocitos de ratas neonatas. (A) Los cardiomiocitos (NRVMs) fueron estimulados con PGF_{2 α} o Fluprostenol (1 μ M) durante 4h, en presencia o ausencia de CsA (100 ng/ml). Para la tinción de las proteínas α -actina sarcomérica y NFATc4 se utilizaron anticuerpos primarios específicos que se detectaron con anticuerpos anti-IgG acoplados a Alexa 488 (verde) o Alexa 555 (rojo), respectivamente. Los núcleos se tiñeron de azul con Dapi. La figura muestra imágenes representativas obtenidas mediante microscopía de fluorescencia. **(B)** Análisis de la intensidad de la señal fluorescente roja (NFATc4) dentro del núcleo, en todas las fotos obtenidas en un experimento realizado por duplicado. Las gráficas muestran los valores de las medias de intensidad de fluorescencia (IF) \pm SD. (*** $p < 0,001$ respecto al control; ### $p < 0,001$ respecto al estímulo en ausencia de CsA).

2.4.2 Regulación de la activación transcripcional dependiente de NFAT por agonistas del receptor FP en cardiomiocitos primarios y en células H9c2

Una vez determinada la implicación de $\text{PGF}_{2\alpha}$ en la activación y translocación de NFAT al núcleo, el siguiente paso fue comprobar su efecto sobre la actividad transcripcional mediada por dicho factor en células cardiacas. Para ello, los cardiomiocitos primarios de ratas neonatas fueron transfectados con un plásmido que contiene el cDNA de la luciferasa bajo el control de elementos de respuesta a NFAT del promotor de la IL-2 (NFAT-luc), en ausencia o en presencia de un plásmido de expresión del receptor FP. Como se muestra en la figura 16A, el tratamiento con los agonistas del receptor FP produjo una inducción de la actividad transcripcional mediada por NFAT. Esta inducción fue mayor en las células transfectadas con el plásmido de expresión del receptor FP humano (Figura 16B). La inducción promovida por los agonistas del FP fue similar a la observada tras la estimulación con TPA en combinación con ionóforos de Ca^{2+} . En todos los casos, la CsA fue capaz de inhibir la inducción de la activación transcripcional mediada por NFAT en respuesta a los distintos estímulos.

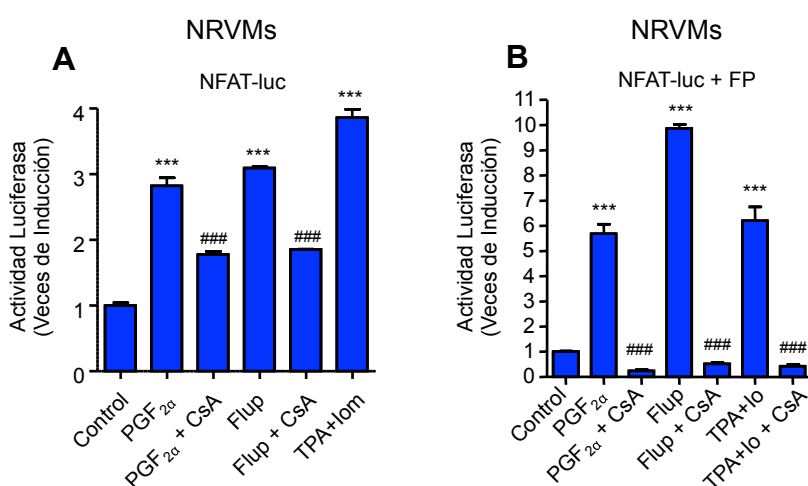


Figura 16. Efecto de los agonistas del FP sobre la activación transcripcional dependiente de NFAT en cardiomiocitos primarios. (A) Los cardiomiocitos de ratas neonatas (NRVMs) fueron transfectados mediante nucleofección con el plásmido NFAT-luc y tratados con CsA (100 ng/ml) desde 1 hora antes de estimular con $\text{PGF}_{2\alpha}$, Fluprostenol (1 μM) o TPA (15 ng/ml) + Ionomicina (Iom; 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 4 horas. **(B)** Los cardiomiocitos se co-transfectaron con el plásmido NFAT-luc junto con un plásmido de expresión del receptor FP humano (pSVL/Flag-hFP-R) mediante lipofección. Posteriormente se trataron con CsA desde 1 hora antes de estimular con $\text{PGF}_{2\alpha}$, Fluprostenol o TPA + Ionóforo (Io; 0,5 μM) durante 4 horas. La actividad luciferasa está representada como veces de inducción ($\text{RLU}_{\text{muestra}}/\text{RLU}_{\text{control}} \pm \text{SD}$) (***) $p < 0,001$ respecto al control, ### $p < 0,001$ respecto al estímulo en ausencia de CsA).

Con el fin de analizar en detalle la relación entre $\text{PGF}_{2\alpha}$ y NFAT, se llevaron a cabo ensayos de transfección en células H9c2 con el plásmido reportero NFAT-luc en presencia o ausencia del plásmido de expresión para el receptor FP (Figura 17A). Mientras que el tratamiento con TPA+Ionóforo fue capaz de inducir la activación transcripcional dependiente de NFAT tanto en ausencia como en presencia del vector de expresión del receptor FP co-transfectado, el Fluprostenol fue capaz de inducir la actividad transcripcional de NFAT únicamente en las células que sobre-expresaban el receptor FP. El tratamiento previo con CsA inhibió por completo la respuesta tanto a Fluprostenol como a TPA+Ionóforo, apoyando la teoría de que estos estímulos activan NFAT a través de una ruta dependiente de calcineurina. En otro experimento similar se transfectaron las células H9c2 con el plásmido NFAT-luc en presencia o ausencia tanto del receptor FP como de un plásmido de expresión para la isoforma NFATc1 (Figura 17B). En este caso observamos que la activación transcripcional de la construcción NFAT-luc se indujo tras el tratamiento de $\text{PGF}_{2\alpha}$ de manera sinérgica cuando se sobre-expresaron tanto el receptor FP como el factor NFATc1.

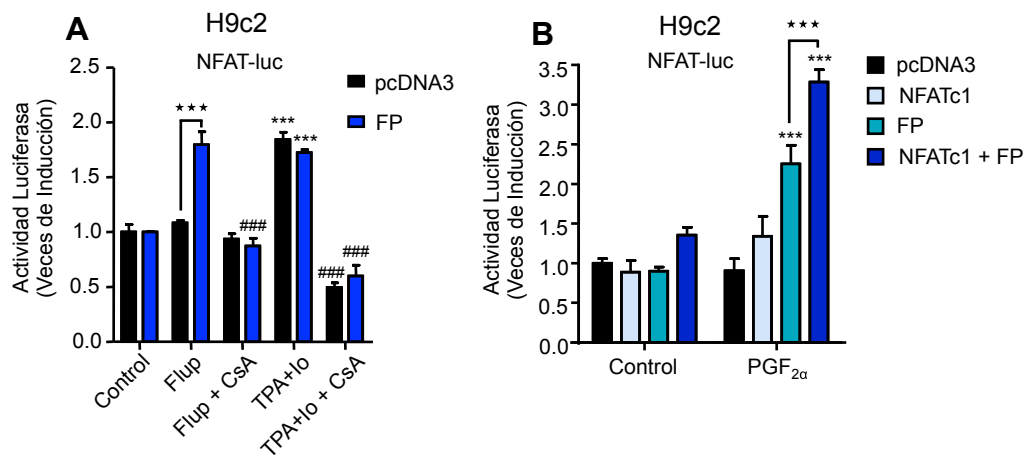


Figura 17. Efecto de los agonistas del FP sobre la activación transcripcional dependiente de NFAT en células H9c2. (A) Las células H9c2 fueron co-transfectadas con el plásmido NFAT-luc junto con el plásmido vacío pcDNA3 o el plásmido de expresión para el receptor FP, tras lo cual se trataron con $\text{PGF}_{2\alpha}$, Fluprostenol (1 μM) o TPA (15 ng/ml) + Ionóforo (Io; 0,5 μM) durante 4 horas en presencia o ausencia de CsA. (B) Las células H9c2 fueron co-transfectadas con el plásmido NFAT-luc junto el plásmido pcDNA3 o con distintas combinaciones de los plásmidos de expresión para el receptor FP y NFATc1. Posteriormente se trataron con $\text{PGF}_{2\alpha}$ durante 4 horas. La actividad luciferasa está representada como veces de inducción ($\text{RLU}_{\text{muestra}}/\text{RLU}_{\text{control}}$) \pm SD (En A, *** $p < 0,001$ respecto al mismo estímulo sin FP; *** $p < 0,001$ respecto al control; ### $p < 0,001$ respecto al mismo estímulo sin CsA). (En B, *** $p < 0,001$ respecto al control, *** $p < 0,001$ respecto al mismo estímulo sin NFATc1).

Como ya se comentó anteriormente, los elementos de respuesta a NFAT de la IL-2 contenidos en el plásmido NFAT-luc están formados por sitios compuestos de unión de NFAT y el complejo AP-1 (Rao et al, 1997). Con el fin de determinar el efecto de los agonistas FP sobre otros elementos de respuesta a NFAT no dependientes de AP-1 en células cardiacas, se realizaron ensayos luciferasa con la construcción IL-13-NFAT-luc (De Boer et al, 1999). El perfil obtenido para la activación transcripcional mediada por el sitio NFAT de la IL-13 tanto en células H9c2 como en cardiomiocitos de rata, fue similar a la observada con el sitio NFAT de la IL-2 (Figura 18). En los dos tipos celulares se observó un incremento en la actividad luciferasa tras el tratamiento con los agonistas $\text{PGF}_{2\alpha}$ o Fluprostenol, en presencia del receptor FP. En las células H9c2 también se observó una inducción tras el tratamiento con TPA + Ionóforo, independientemente de la presencia o ausencia del receptor (Figura 18A). El tratamiento previo con CsA consiguió inhibir la inducción de la actividad luciferasa en cardiomiocitos primarios (Figura 18B).

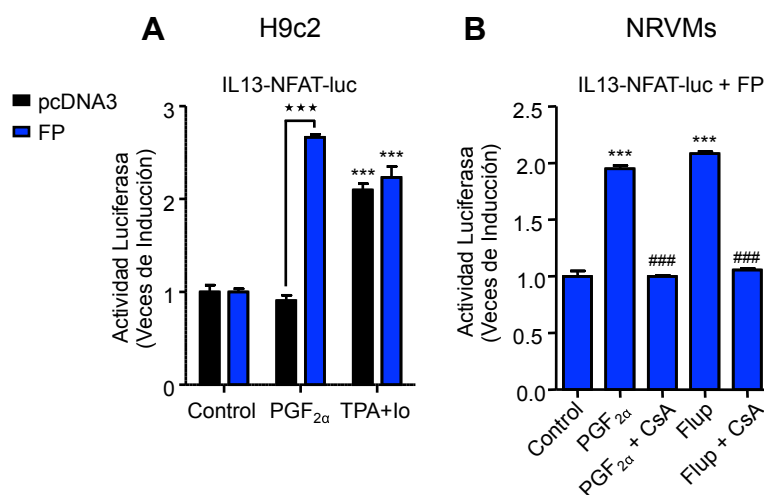


Figura 18. Efecto de los agonistas del FP sobre la activación transcripcional mediada por el sitio NFAT de la IL13. Los diferentes tipos celulares fueron co-transfectados con el plásmido IL13-NFAT-luc junto con el plásmido vacío pcDNA3 o el plásmido de expresión del receptor FP pSVL/Flag-hFP-R, tras lo cual se trataron con $\text{PGF}_{2\alpha}$, Fluprostenol ($1 \mu\text{M}$) o TPA + Ionóforo ($15 \text{ ng/ml} + 0,5 \mu\text{M}$) durante 4 horas. La CsA (100 ng/ml) se añadió 1 hora antes de los estímulos. **(A)** Células H9c2, **(B)** cardiomiocitos de ratas neonatas (NRVMs). La actividad luciferasa está representada como veces de inducción ($\text{RLU}_{\text{muestra}}/\text{RLU}_{\text{control}}$) \pm SD (En A *** $p < 0,001$; *** $p < 0,001$ respecto al control). (En B, *** $p < 0,001$ respecto al control, ### $p < 0,001$ respecto al mismo estímulo sin CsA).

2.4.2.1 Análisis de la activación transcripcional de NFAT a través de diferentes receptores de prostanoideos.

De forma análoga a lo realizado en linfocitos T (figura 4C), decidimos comprobar si los agonistas del FP pudieran estar regulando la actividad transcripcional de NFAT a través de otros receptores de prostanoideos en células cardiacas. Para ello, las células H9c2 se co-transfectaron con el plásmido indicador NFAT-luc junto con el vector vacío pcDNA3, o vectores de expresión para los receptores FP, EP1 o EP4. Tras la transfección, las células se trataron tanto con PGE₂ (10 nM), como con PGF_{2α} o Fluprostenol (10 nM y 1 μM). En las células H9c2 transfectadas con el FP, el tratamiento tanto con PGF_{2α} como con Fluprostenol a cualquiera de las dosis estudiadas produjo un incremento de la actividad transcripcional de NFAT que no tuvo lugar cuando el tratamiento fue con PGE₂ (Figura 19). En el caso de las células H9c2 transfectadas con el receptor EP1, se observó un claro aumento de la actividad luciferasa esencialmente tras el tratamiento con PGE₂, si bien a la dosis de 1 μM de PGF_{2α} se pudo observar también un ligero aumento. Por último, el tratamiento con cualquiera de los estímulos en células H9c2 transfectadas con el receptor EP4 no produjo cambios en la actividad transcripcional de NFAT respecto a las células transfectadas con pcDNA3 (Figura 19).

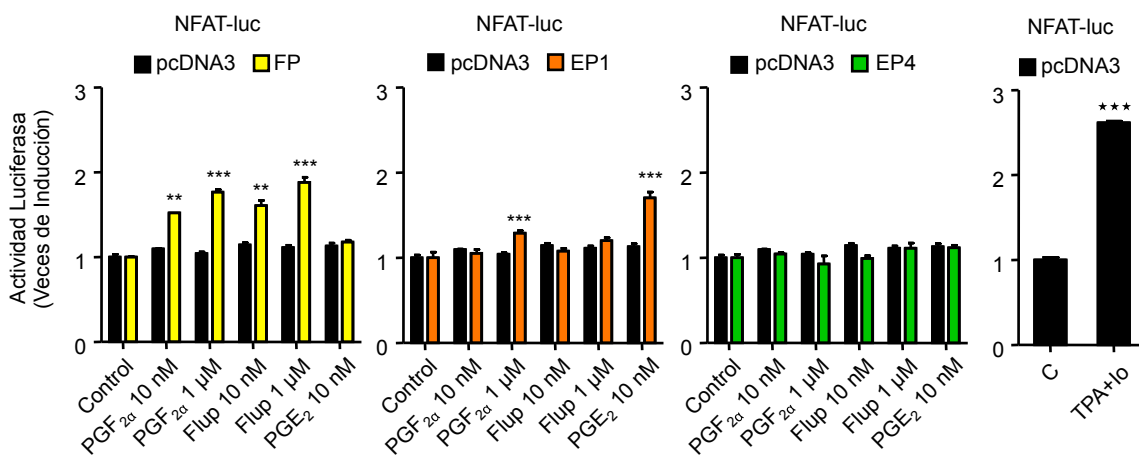


Figura 19. Efecto de los agonistas del FP sobre la activación transcripcional de NFAT a través de diferentes receptores de prostaglandinas. Las células H9c2 fueron co-transfectadas con el plásmido NFAT-luc junto con el plásmido control pcDNA3 o plásmidos de expresión para los receptores FP, EP1 o EP4. Las células fueron tratadas con PGF_{2α} o Fluprostenol (10 nM y 1 μM), PGE₂ (10 nM) o TPA + Ionóforo (15 ng/ml + 1 μM) durante 4 horas. La actividad luciferasa está representada como veces de inducción ($RLU_{muestra}/RLU_{control}$) ± SD (** p<0,01; *** p<0,001 respecto al mismo estímulo sin receptor; *** p<0,001 respecto al control).

2.4.2.2 Dependencia de la interacción del receptor FP con la proteína Gαq en la activación de NFAT por PGF_{2α}

Como en el caso de células Jurkat (Figura 5), se procedió a analizar el papel de la subunidad Gαq y de la quinasa GRK2 en la inducción de la transcripción dependiente de NFAT en cardiomiocitos, tras la activación del receptor FP. Para ello, se realizaron ensayos luciferasa con NFAT-luc, en cardiomiocitos de rata neonatales transfectados con vectores de expresión de la proteína Gαq y de la quinasa GRK2, ya fuera la GRK2 *wt* o la GRK2 mutada GRK2 K220R. Los resultados obtenidos muestran un patrón similar al descrito en células Jurkat, poniendo de manifiesto el papel de Gαq en la activación de NFAT, y su cooperación con el receptor FP, en respuesta a la PGF_{2α} (Figura 20A). Así mismo, se observó la interferencia de la GRK2, ya fuera *wt* o mutada, sobre la activación de NFAT vía FP en cardiomiocitos (Figura 20B).

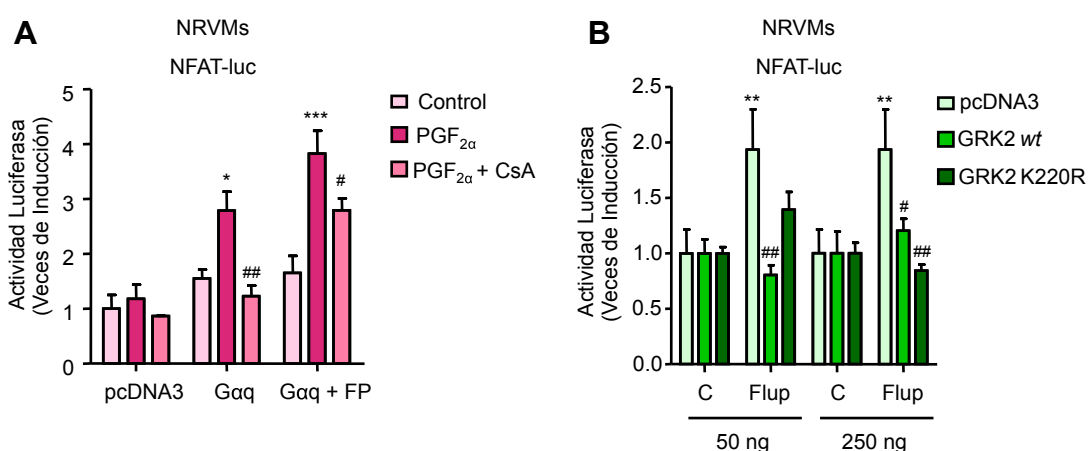


Figura 20. Efectos de la expresión de Gαq o GRK2 sobre la regulación de la activación transcripcional dependiente de NFAT por los agonistas del receptor FP (A) Los cardiomiocitos fueron co-transfectados con el plásmido NFAT-luc junto con el plásmido control pcDNA3 o el plásmido de expresión para Gαq sólo o junto con el plásmido de expresión del receptor FP. Las células se trataron con CsA (100 ng/ml) desde una hora antes de estimular con PGF_{2α} (1 μM) durante 4 horas. La actividad luciferasa está representada como veces de inducción ($RLU_{muestra} / RLU_{control} \pm SD$). (***) $p < 0,001$; * $p < 0,05$ respecto al control) (### $p < 0,01$; # $p < 0,05$ respecto al estímulo en ausencia de CsA). **(B)** Los cardiomiocitos fueron co-transfectados con el plásmido NFAT-luc junto con el plásmido control pcDNA3 o con distintas cantidades de plásmidos de expresión de las proteínas GRK2 en su versión silvestre (GRK2 *wt*) o su versión mutada (GRK2 K220R) en presencia del plásmido de expresión del receptor FP. Las células se trataron con Fluprostenol (1 μM) durante 4 horas. La actividad luciferasa está representada como veces de inducción ($RLU_{muestra} / RLU_{control} \pm SD$) (** $p < 0,01$ respecto al control). (### $p < 0,01$; # $p < 0,05$ respecto al mismo estímulo en ausencia de GRK2 *wt* o GRK2 K220R).

En conclusión, los resultados obtenidos sobre la activación de NFAT en cardiomiocitos ponen de manifiesto la activación de la ruta Ca²⁺/calcineurina/NFAT a través de la señalización de los agonistas del FP, receptor acoplado a proteínas G, y en particular, a su acoplamiento con la subunidad Gαq. Como consecuencia de la activación de la ruta de NFAT, se promueve su paso al núcleo y la activación transcripcional dependiente de este factor de transcripción.

2.5 Regulación de la expresión génica por $\text{PGF}_{2\alpha}$ en células cardiacas

Las cascadas de señalización intracelulares desencadenadas por los diversos estímulos hipertróficos en cardiomiocitos se traducen finalmente en una serie de cambios en la transcripción de numerosos genes. En vista de los resultados obtenidos sobre el efecto hipertrófico de agonistas del receptor FP como la $\text{PGF}_{2\alpha}$ y el Fluprostenol en cardiomiocitos y sobre la activación de la expresión génica dependiente de NFAT, el siguiente paso fue analizar las acciones de estos agonistas sobre la expresión génica. Por un lado se estudiaron genes en cuya expresión NFAT juega un papel esencial como COX-2 o RCAN-1, además de otros considerados marcadores de hipertrofia cardiaca como β -MHC (β -Myosin heavy chain, isoforma β de la cadena pesada de la miosina), ANP (*Atrial natriuretic peptide*) y BNP (*Brain o B-type natriuretic peptide*).

2.5.1 Efectos de $\text{PGF}_{2\alpha}$ sobre la expresión de COX-2 en células cardiacas

Los procesos inflamatorios han sido identificados como un componente clave en el remodelado ventricular derivado del daño miocárdico (Nagalla et al, 2012). La enzima COX-2 es un importante mediador de la inflamación en estados de estrés y enfermedad, y también se ha asociado su inducción con la aparición de hipertrofia cardiaca (Streicher et al, 2010).

Además de otros factores de transcripción, tales como NF κ B, NF-IL6/CEBP, CREBP o AP-1, NFAT juega un papel esencial en la regulación de COX-2 en diversos tipos celulares (Corral et al, 2007; Duque et al, 2005; Hernandez et al, 2001; Iniguez et al, 2000; Xie & Herschman, 1996).

2.5.1.1 Inducción de la expresión de COX-2 mediada por NFAT

Los efectos de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ sobre la regulación de COX-2 se analizaron tanto en células H9c2 como en cardiomiocitos de ratas neonatas. En primer lugar se analizó mediante RT-PCR cuantitativa la expresión del ARNm de COX-2 tras el tratamiento con los agonistas del FP, $\text{PGF}_{2\alpha}$ o Fluprostenol, o con el ionóforo de Ca^{2+} Ionomicina. Como se observa en la figura 21A, la expresión de COX-2 en células H9c2 se vio ligera, aunque significativamente inducida, tras el tratamiento con $\text{PGF}_{2\alpha}$. Esta inducción fue más acusada cuando el tratamiento fue con Ionomicina. Del mismo modo, en los cardiomiocitos primarios también se indujo la expresión del mensajero de COX-2 tras el tratamiento con $\text{PGF}_{2\alpha}$ o con Fluprostenol (Figura 21B). En ambos casos, el tratamiento con CsA disminuyó sensiblemente la inducción de la expresión mediada tanto por los agonistas del FP como por Ionomicina.

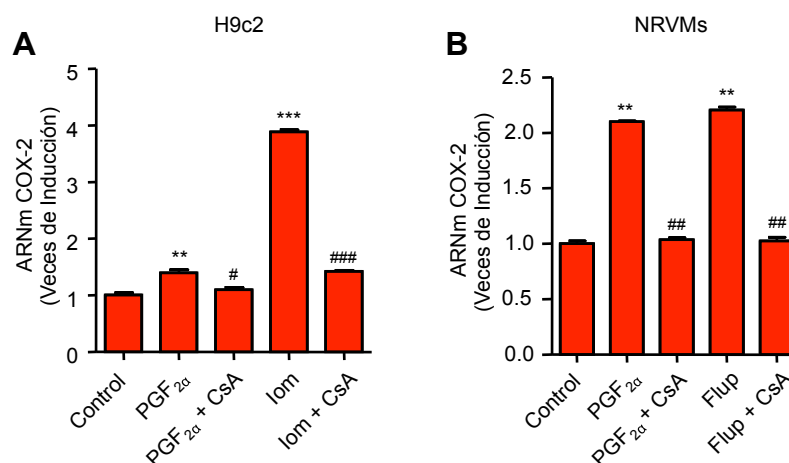


Figura 21. Efecto de los agonistas del receptor FP sobre los niveles de ARNm de COX-2 en células H9c2 y en cardiomiocitos de rata. Las células H9c2 (A) o los cardiomiocitos de rata (NRVMs) (B), fueron tratados con PGF_{2α}, Fluprostenol (1 μM) o Ionomicina (Iom; 0,5 μg/ml) durante 4 horas, en presencia o ausencia de CsA (100 ng/ml). Los niveles de ARNm de COX-2 se analizaron mediante RT-PCR cuantitativa usando como referencia los niveles del ARNr 18S. Las gráficas muestran un experimento significativo, en el cual, los datos obtenidos por triplicado, están representados como veces de inducción con respecto a los valores obtenidos en las células sin tratar (expresión relativa de ARNm en la muestra/expresión relativa de ARNm en las células control) ± SD. (***) p<0,001; ** p<0,01 respecto al control) (### p<0,001; ## p<0,01; # p<0,05 respecto al mismo estímulo sin CsA).

La inducción de COX-2 en células H9c2 y en cardiomiocitos en respuesta a PGF_{2α} o Fluprostenol se confirmó mediante el análisis por *Western Blot* de los niveles de proteína. La inducción de COX-2 en respuesta a estos estímulos tuvo lugar a tiempos tempranos de estimulación, declinando posteriormente (Figuras 22A y B). La inducción de COX-2, tanto por agonistas del receptor FP como la promovida por Ionomicina fue inhibida sustancialmente en presencia de CsA (Figura 22B).

Estos resultados se confirmaron en cardiomiocitos de ratas neonatas, donde la inducción de la expresión de COX-2 por agonistas del FP o por TPA+Ionóforo fue más evidente. De nuevo, el tratamiento con CsA disminuyó la inducción de COX-2 en respuesta a dichos estímulos (Figura 22C).

Teniendo en cuenta estos resultados, y debido a la importancia de COX-2 en la síntesis de prostanoides entre los que se encuentra la propia PGF_{2α}, se decidió analizar si la inducción de COX-2 observada se traducía en variaciones en la producción de prostanoides. Para ello se analizó, mediante ensayos ELISA, la producción de PGF_{2α} en sobrenadantes de células H9c2 incubadas con ácido araquidónico que habían sido previamente tratadas con distintas combinaciones de ionóforo de Ca²⁺ y TPA. La producción

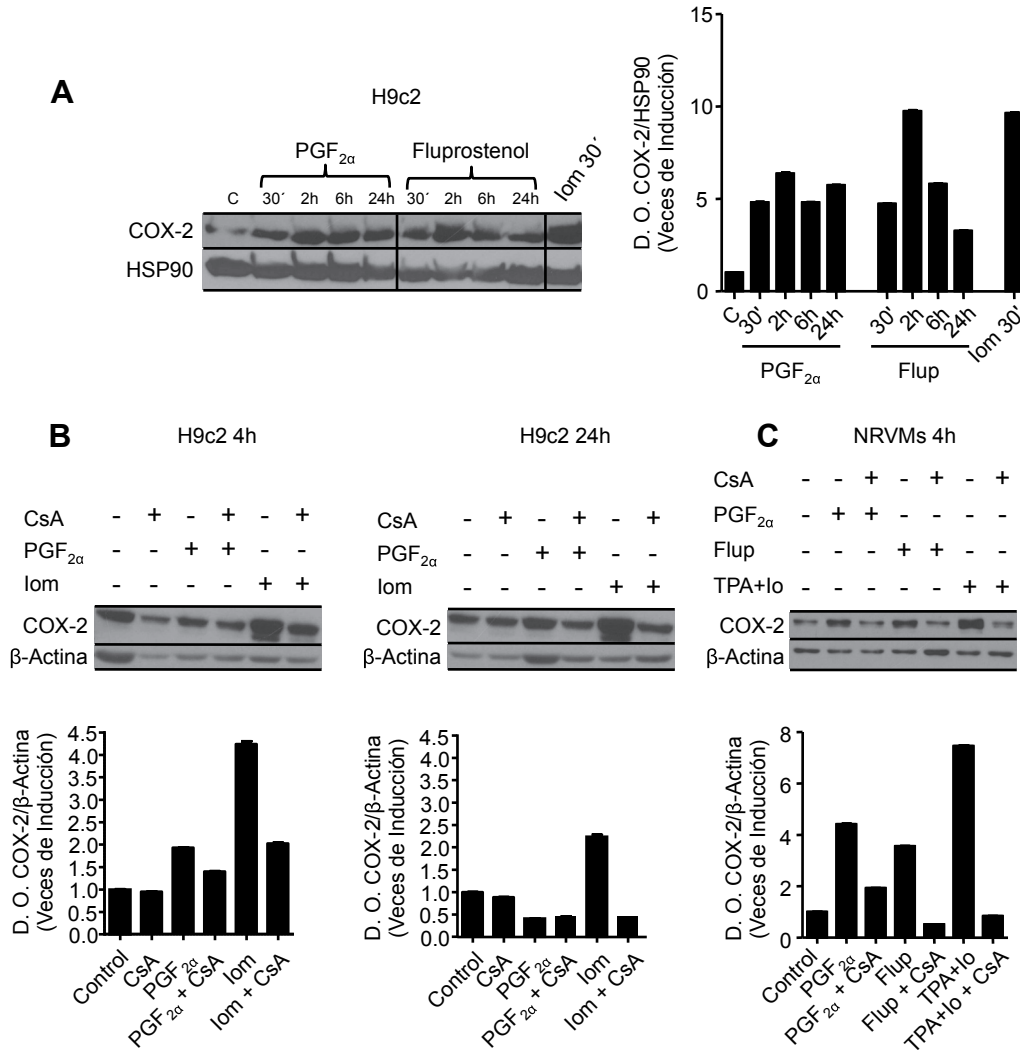


Figura 22. Análisis de la expresión de la proteína COX-2 en células H9c2 y cardiomiocitos primarios. (A) Las células H9c2 fueron tratadas con PGF_{2α} o Fluprostenol (1 μM) a diferentes tiempos (30 min a 24 h) o con Ionomicina (Iom; 0,5 μg/ml) durante 30 minutos. (B) Las células H9c2 fueron tratadas con PGF_{2α} o Iom durante 4 horas o 24 horas, en presencia o ausencia de CsA (100 ng/ml). (C) Los cardiomiocitos de ratas neonatas (NRVMs) fueron tratados con los agonistas del FP PGF_{2α} o Fluprostenol (1 μM) o TPA (15 ng/ml) + Ionóforo (Io; 0,5 μM) durante 4 horas, en presencia o ausencia de CsA. En todos los casos se obtuvieron extractos totales de proteína que se analizaron por *Western Blot* con anticuerpos específicos para COX-2. Los resultados se muestran como *Westerns blots* representativos de los experimentos realizados. Las gráficas corresponden al análisis densitométrico de los *blots*, normalizado por la expresión de HSP90 o β-actina.

de esta prostaglandina se incrementó de forma significativa tras el tratamiento con ionóforo de Ca²⁺, sólo o en combinación con TPA. En ambos casos, el tratamiento previo con CsA inhibió el incremento observado en la producción de PGF_{2α} (Figura 23A). De forma similar, en cardiomiocitos de rata se observó un incremento tanto en la producción de PGF_{2α} como de PGE₂ en respuesta al tratamiento con Ionomicina y TPA (Figura 23B).

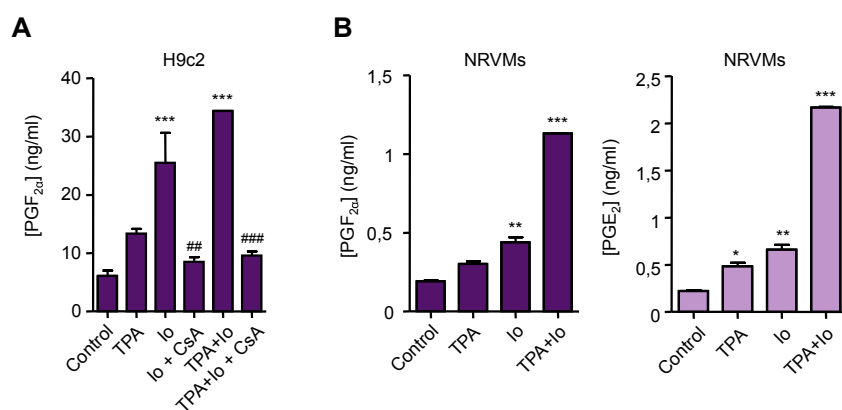


Figura 23. Producción de PGF_{2α} y PGE₂ en células cardíacas: Las células se trataron con TPA (15 ng/ml), Ionóforo de calcio (Io; 0,5 μM) o la combinación de ambos (TPA+Io) durante 4 horas, en presencia o ausencia de CsA (100 ng/ml). La producción de PGF_{2α} o PGE₂ se determinó medida ELISA en los sobrenadantes celulares, previa incubación con ácido araquidónico, como se detalla en *Materiales y métodos*. **(A)** Células H9c2 **(B)** Cardiomiocitos de ratas neonatas. (***) p<0,001; ** p<0,01; * p<0,05 respecto al control) (### p<0,001; ## p<0,01 respecto al mismo estímulo sin CsA).

2.5.1.2 Efectos de la PGF_{2α} sobre el promotor de COX-2

Con el fin de determinar si la inducción de COX-2 observada tras el tratamiento con agonistas del receptor FP se producía a nivel transcripcional, analizamos el efecto de la PGF_{2α} y el Fluprostenol sobre la actividad del promotor de COX-2. Este promotor contiene varias secuencias que regulan su actividad, entre las que destacan los sitios de unión a factores de transcripción como NFκB, AP-1, AP2 o NF-IL6/CEBP, además de un elemento de respuesta a AMPc (CRE). Además, nuestro grupo identificó dos sitios de unión para el factor NFAT en las posiciones -71 (NFATp, proximal) y -101 (NFATd, distal) con respecto al sitio de inicio de la transcripción del gen (Iniguez et al, 2000) (Figura 24A). Para este estudio, las células H9c2 se co-transfectaron con el vector de expresión para el receptor FP, junto con diferentes construcciones en las que la actividad luciferasa estaba bajo el control de distintos fragmentos del promotor de COX-2. Estas construcciones contienen deleciones que abarcan desde la posición -1796 a la -46 respecto del sitio de inicio de la transcripción (Figura 24A). El tratamiento, tanto con los agonistas del FP, PGF_{2α} y Fluprostenol, como con TPA + Ionomicina, indujo la actividad luciferasa dirigida por las construcciones P2-1900 y P2-274 que contienen los sitios de respuesta a NFAT, mientras que la actividad luciferasa de la construcción P2-150, carente de las principales secuencias reguladoras, no se vio alterada. El tratamiento previo con CsA consiguió inhibir la inducción de las construcciones 1900 y 274 del promotor de COX-2 (Figura 24B).

Estos resultados se confirmaron en cardiomiocitos primarios de ratas neonatas co-transfectados con la construcción P2-1900-luc junto con el plásmido de expresión del receptor FP, y tratadas tanto con los agonistas del receptor como con TPA + Ionóforo. En la figura 24C se puede observar cómo estos tratamientos indujeron la actividad del promotor de COX-2, y cómo la CsA fue capaz de inhibir dicha inducción de manera significativa.

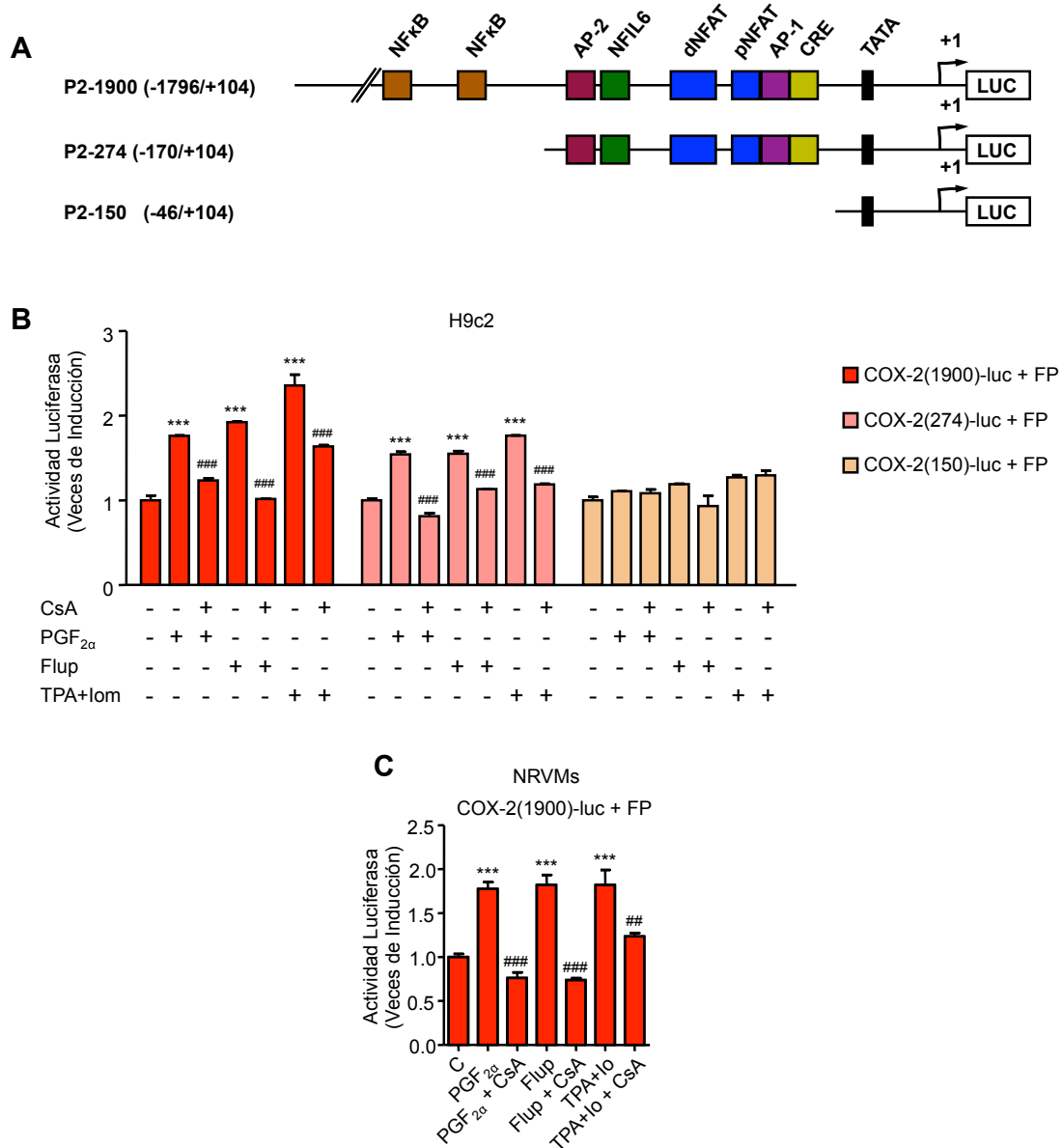


Figura 24. Regulación de la actividad transcripcional del promotor de COX-2 por agonistas del receptor FP en células H9c2 y cardiomiocitos primarios. (A) Esquema de las diferentes construcciones del promotor de la COX-2 usadas, en el que se muestran los elementos de respuesta para los factores de transcripción NF-κB, NF-IL6, AP-2, NFAT, AP-1 y CRE. **(B)** Las células H9c2 fueron co-transfectadas con las distintas construcciones del promotor de COX-2 junto con el plásmido de expresión del receptor FP, pSVL/Flag-hFP-R. Las células se trataron con los agonistas del FP, PGF_{2α} o Fluprostenol (1 μM) o con TPA + Ionomicina (15 ng/ml + 0,5 μg/ml) durante 4 horas, en presencia o ausencia de CsA (100 ng/ml) , y se midió la actividad luciferasa en los lisados celulares. **(C)** Los cardiomiocitos de ratas neonatas (NRVMs) fueron co-transfectados con el plásmido pCOX-2(1900)-luc junto con el plásmido de expresión del receptor FP. Tras la transfección, los cardiomiocitos fueron tratados con los agonistas del FP, PGF_{2α} o Fluprostenol o con TPA + Ionóforo durante 4 horas, en presencia o ausencia de CsA. Los resultados se muestran como veces de inducción ($RLU_{muestra}/RLU_{control}$) ± SD (***) p<0,001 respecto al control). (### p<0,001; ##p<0,01 respecto al mismo estímulo sin CsA).

2.5.2 Efectos de $\text{PGF}_{2\alpha}$ sobre la expresión de RCAN-1 en células cardíacas

Las proteínas RCAN (*Regulator of Calcineurin*) pertenecen a una familia de proteínas moduladoras de la fosfatasa calcineurina. Entre éstas, RCAN-1 se encuentra regulado a su vez por la calcineurina, en tanto en cuanto la expresión de RCAN-1 se induce tras la activación de dicha fosfatasa a través de la activación de NFAT y su unión a elementos de respuesta en el promotor de RCAN-1 (Park et al, 2009; Vega et al, 2003; Yang et al, 2000). Además por el hecho de ser un gen dependiente de NFAT, RCAN-1 ha sido implicado en el proceso hipertrófico (Rothermel et al, 2001; van Rooij et al, 2004), por lo que nos decidimos analizar los posibles efectos de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ en la regulación del mismo en cardiomiocitos.

2.5.2.1 Inducción de la expresión de RCAN-1 en células cardíacas

En primer lugar se llevaron a cabo ensayos de RT-PCR cuantitativa para analizar los niveles del ARNm de RCAN-1 tras el tratamiento con $\text{PGF}_{2\alpha}$ o Ionomicina. En la figura 25 se muestra cómo la expresión de RCAN-1 en células H9c2 se vio significativamente inducida tras el tratamiento con $\text{PGF}_{2\alpha}$, y en mayor medida tras el tratamiento con Ionomicina. El tratamiento con CsA disminuyó sensiblemente la inducción de la expresión mediada por ambos estímulos.

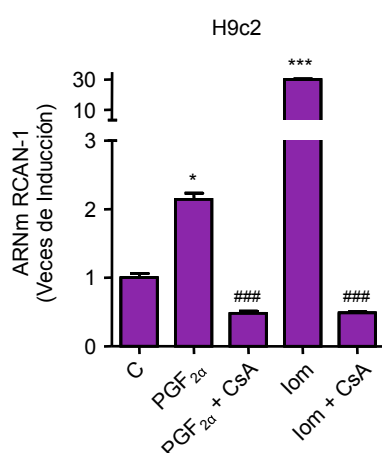


Figura 25. Regulación de la expresión de RCAN-1 por $\text{PGF}_{2\alpha}$ en células H9c2. Las células H9c2 fueron tratadas con $\text{PGF}_{2\alpha}$ (1 μM) o Ionomicina (0,5 $\mu\text{g/ml}$) durante 4 horas, en presencia o ausencia de CsA (100 ng/ml). Los niveles de ARNm de RCAN-1 se analizaron mediante RT-PCR cuantitativa, tomando como referencia los niveles del ARNr 18S. Se muestra la gráfica de un experimento representativo, con los datos representados como $\text{RQ} \pm \text{SD}$ (***) $p < 0,001$; * $p < 0,05$ respecto al control). (###) $p < 0,001$ respecto al mismo estímulo sin CsA).

El análisis mediante *Western Blot* en células H9c2, reveló que la inducción de la proteína RCAN-1 por $\text{PGF}_{2\alpha}$ se produce a tiempos cortos de estimulación (4h), disminuyendo posteriormente (24h) mientras que la inducción con Ionomicina, aunque disminuye, se mantiene hasta las 24 h. (Figura 26A). Estos resultados se confirmaron de nuevo en cardiomiocitos primarios de ratas neonatas, donde se observaron inducciones más acusadas en presencia de agonistas del receptor FP (Figura 26C). El tratamiento con TPA+Ionóforo produjo un aumento considerable de la expresión de RCAN-1. El tratamiento con CsA disminuyó notablemente la inducción de RCAN-1 ante dichos estímulos.

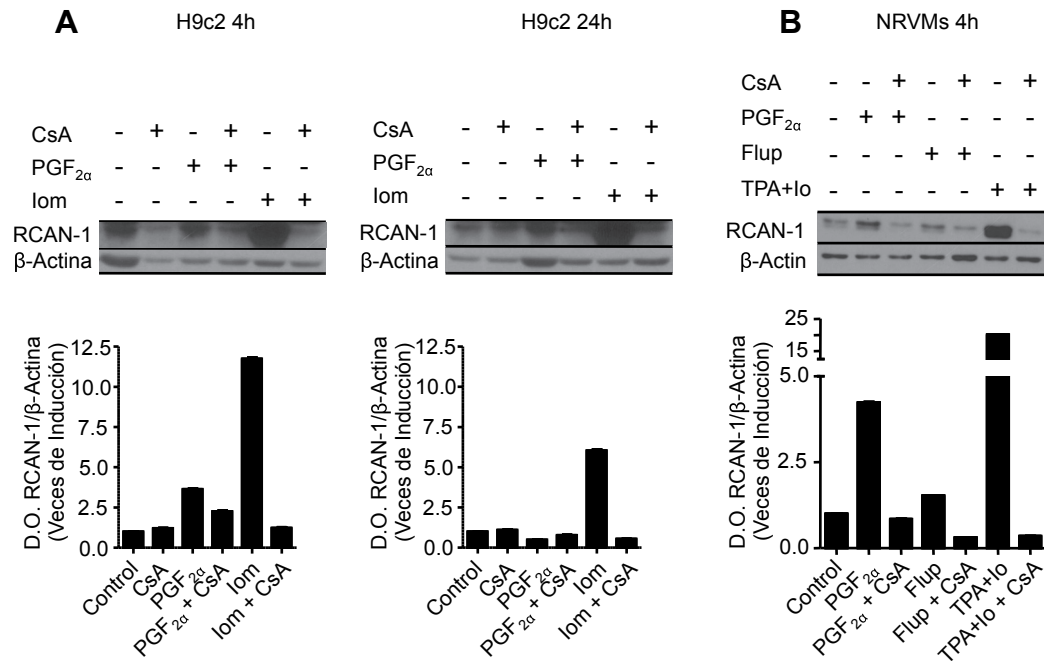


Figura 26. Regulación de la expresión de RCAN-1 por agonistas del receptor FP en células H9c2 y en cardiomiocitos primarios. (A) Las células H9c2 fueron tratadas con PGF_{2α} (1 μM) o Ionomicina (Iom; 0,5 μg/ml) durante 4 horas o 24 horas, en presencia o ausencia de CsA (100 ng/ml). **(B)** Los cardiomiocitos de ratas neonatas (NRVMs) se trataron con los agonistas del FP, PGF_{2α} o Fluprostenol (1 μM) o con TPA + Ionóforo (15 ng/ml + 0,5 μM) durante 4 horas, en presencia o ausencia de CsA. En todos los casos se obtuvieron extractos totales de proteína que se analizaron por *Western Blot* con anticuerpos específicos para RCAN-1. Los resultados se muestran como *Westerns blots* representativos de los experimentos realizados. Las gráficas corresponden al análisis densitométrico de las bandas, normalizado respecto al control de carga β-Actina.

2.5.2.2 Efectos de la PGF_{2α} sobre el promotor de RCAN-1

El análisis de la actividad del promotor de RCAN-1 en células cardiacas se llevó a cabo mediante ensayos luciferasa en células H9c2 o cardiomiocitos primarios transfectados con diferentes construcciones del mismo (-1666/+83 y -350/+83) (Figura 27A). Entre las secuencias reguladoras presentes en el promotor de este gen se encuentran, además de varios sitios de unión a NFAT, otros elementos de respuesta a factores como C/EBPβ, ATF6 y GATA-2/3, los cuales cooperan con NFAT en la regulación de RCAN-1 (Belmont et al, 2008; Minami et al, 2004; Oh et al, 2010). El tratamiento tanto con los agonistas del FP, PGF_{2α} y Fluprostenol en presencia del receptor FP, como con TPA + Ionomicina en cualquier caso, indujo la actividad luciferasa dirigida por ambas construcciones del promotor de RCAN-1, siendo mayores los efectos con la construcción -1664/+83, que contiene secuencias adicionales de respuesta a NFAT. El tratamiento previo con CsA consiguió inhibir la inducción del promotor de RCAN-1 (Figura 27B).

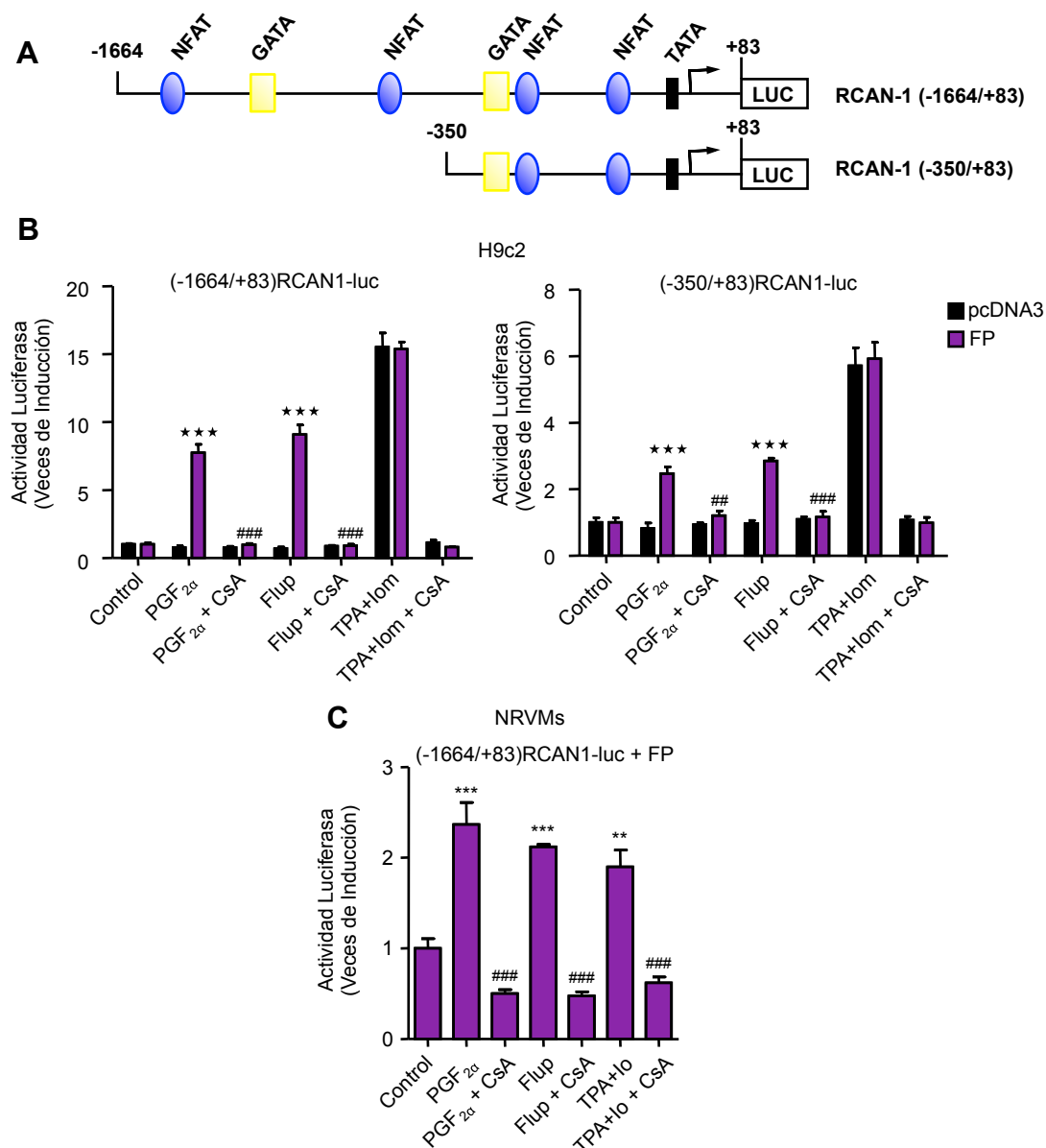


Figura 27. Efecto de los agonistas del receptor FP sobre la actividad del promotor de RCAN-1 en células H9c2 y en cardiomiocitos de rata. (A) Esquema de las diferentes construcciones del promotor de RCAN-1 usadas en el ensayo, en el que se muestran los elementos de respuesta para los factores de transcripción NFAT y GATA. **(B)** Las células H9c2 se co-transfectaron con distintas construcciones del promotor de RCAN-1 ligadas al gen de la luciferasa, junto con el plásmido vacío pcDNA3 o un plásmido de expresión del receptor FP, pSVL/Flag-hFP-R. A continuación se trataron con PGF_{2α}, Fluprostenol (1 μM) o TPA + Ionomicina (15 ng/ml + 0,5 μg/ml) durante 4 horas. La CsA (100 ng/ml) se añadió 1 hora antes de los estímulos. **(C)** Los cardiomiocitos de ratas neonatas (NRVMs) se transfectaron con el plásmido (-1664/+83) RCAN1-luc junto con el plásmido de expresión del receptor FP y se trataron con CsA (100 ng/ml) durante 1 hora antes de estimular con PGF_{2α}, Fluprostenol (1 μM) o TPA + Ionóforo (15 ng/ml + 0,5 μM) durante 4 horas. La actividad luciferasa está representada como veces de inducción ($RLU_{muestra}/RLU_{control}$) ± SD (*** p<0,001 respecto al mismo estímulo sin receptor; ** p<0,01; *** p<0,001 respecto al control; ## p<0,01, ### p<0,001 respecto al mismo estímulo en ausencia de CsA)

Los resultados observados en H9c2 se confirmaron en cardiomiocitos primarios de ratas neonatas que fueron co-transfectados con la construcción RCAN-1(-1664/+83)-luc junto con el plásmido de expresión del FP, y tratadas tanto con los agonistas del receptor, como con TPA + Ionóforo. En la figura 27C se puede observar cómo los tratamientos indujeron la actividad luciferasa dirigida por el promotor de RCAN-1, y cómo la CsA fue capaz de inhibir dicha inducción de manera significativa.

2.5.3 Regulación de la expresión de genes marcadores de hipertrofia cardiaca (β -MHC, ANP y BNP) por $\text{PGF}_{2\alpha}$

La generación de hipertrofia cardiaca patológica se acompaña de la reprogramación en la expresión de genes miocárdicos, de manera que los genes que codifican para las isoformas fetales de proteínas como la cadena pesada de la miosina β (β -MHC) o la α -actina esquelética se ven inducidos, mientras que las correspondientes isoformas del adulto se ven reprimidas (Morkin, 2000). Los péptidos natriuréticos atrial (ANP) y tipo B (o *Brain*, BNP) también son inducidos de manera temprana en el corazón en respuesta a señales hipertróficas (Molkentin et al, 1998). En la regulación de estos genes intervienen diversos factores de transcripción como SRF, TEF-1, AP-1 y Sp1 (Kariya et al, 1993; Karns et al, 1995; Kovacic-Milivojevic et al, 1996). También se ha descrito la implicación del factor NFAT en la inducción de estos marcadores hipertróficos (Bai & Kerppola, 2011), por lo que nos preguntamos si la $\text{PGF}_{2\alpha}$, a través de NFAT, podría tener un papel en la regulación de estos genes.

Tanto la $\text{PGF}_{2\alpha}$ en células H9c2, como el Fluprostenol, en cardiomiocitos primarios o la Ionomicina, en ambos tipos celulares, fueron capaces de inducir la expresión de β -MHC, analizada por RT-PCR cuantitativa (Figura 28A). En todos los casos, el tratamiento previo con CsA consiguió inhibir la inducción observada.

Un patrón de expresión similar se observó en el análisis de la expresión de ANP en cardiomiocitos primarios, con una inducción por Fluprostenol o Ionomicina y la inhibición de ésta en presencia de CsA (Figura 28B).

Con el fin de determinar si la inducción de ANP se producía también a nivel transcripcional, se llevaron a cabo ensayos de co-transfección con una construcción que contiene un fragmento del promotor de ANP (-638/+62) dirigiendo la expresión del gen indicador luciferasa, junto con el vector de expresión para el receptor FP. El tratamiento con los agonistas del receptor promovió una inducción de la actividad luciferasa tanto en células H9c2 (Figura 29A) como en cardiomiocitos primarios (Figura 29B), siendo en las células H9c2 imprescindible la presencia del receptor FP para observar dichos efectos. El tratamiento con CsA previno la inducción mediada por los agonistas en ambos tipos celulares.

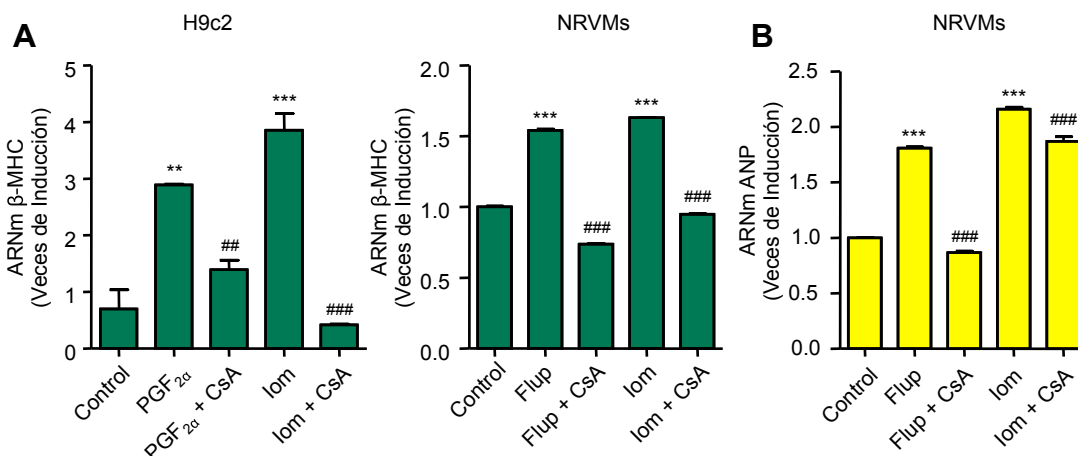


Figura 28. Efecto de los agonistas del receptor FP sobre la expresión de β -MHC y ANP en células H9c2 y en cardiomiocitos de rata. Células H9c2 o cardiomiocitos de ratas neonatales (NRVMs) se trataron con los agonistas del receptor FP, PGF_{2 α} y Fluprostenol (1 μ M), o con Ionomicina (lom; 0,5 μ g/ml) durante 4 horas, en presencia o ausencia de CsA (100 ng/ml). **(A)** Análisis mediante RT-PCR cuantitativa de los niveles de ARNm de β -MHC en células H9c2 o en cardiomiocitos de rata. **(B)** Estudio de los niveles de ARNm de ANP en cardiomiocitos. Se muestran las gráficas de experimentos representativos, con los datos representados como veces de inducción \pm SD con respecto al control, y tomando como referencia los niveles del ARNr 18S. (***) $p < 0,001$ ** $p < 0,01$ respecto al control; ### $p < 0,001$; ## $p < 0,01$ respecto al mismo estímulo sin CsA).

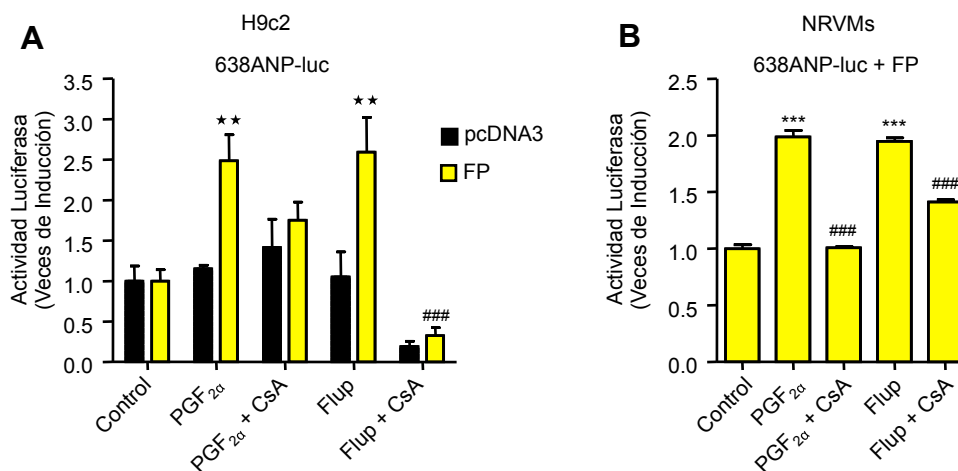


Figura 29. Efecto de los agonistas del receptor FP sobre la actividad del promotor de ANP en células H9c2 y en cardiomiocitos de rata. Las células H9c2 **(A)**, o los cardiomiocitos primarios de ratas neonatas (NRVMs) **(B)**, se co-transfectaron con el plásmido 638ANP-luc junto con el plásmido control pcDNA3 o el plásmido de expresión del receptor FP, pSVL/Flag-hFP-R, según se indica. A continuación se trataron con PGF_{2 α} o Fluprostenol (1 μ M) durante 4 horas, en presencia o ausencia de CsA (100 ng/ml). La actividad luciferasa está representada como veces de inducción ($RLU_{muestra}/RLU_{control}$) \pm SD. (** $p < 0,01$ respecto al mismo estímulo sin receptor; *** $p < 0,001$ respecto al control; ### $p < 0,001$ respecto al mismo estímulo en ausencia de CsA).

En el caso del gen BNP, el análisis de su expresión por RT-PCR en células H9c2 parece revelar una ligera inducción por parte de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ o la Ionomicina, si bien los efectos más evidentes fueron aquéllos promovidos por el tratamiento con TPA + Ionomicina, el cual muestra un claro efecto inductor temprano (4h), que decae con el tiempo (24h) (Figura 30A). De forma similar, en cardiomiocitos primarios tras el tratamiento durante 24 horas, sólo la Ionomicina y la combinación de TPA+Ionomicina de forma más evidente, fueron capaces de promover un aumento de la expresión de BNP. El tratamiento con CsA tan sólo produjo un ligero efecto inhibitorio significativo sobre la inducción de la expresión de BNP en cardiomiocitos (Figura 30B). De acuerdo con los resultados obtenidos en la RT-PCR, el tratamiento combinado con TPA+Ionóforo produjo una inducción de la actividad del promotor de BNP (BNP-luc) en cardiomiocitos. A pesar de no observar una inducción significativa de los niveles de mRNA de BNP tras el tratamiento con Fluprostenol en cardiomiocitos, este agonista, fue capaz de inducir la actividad transcripcional del promotor de BNP a 4 horas de estimulación en cardiomiocitos que sobre-expresaban el receptor FP (Figura 30C).

En conclusión, los resultados obtenidos ponen de manifiesto la implicación de $\text{PGF}_{2\alpha}$ y agonistas del receptor FP como el Fluprostenol en la inducción de genes dependientes del factor de transcripción NFAT, como COX-2 y RCAN-1, en cardiomiocitos. La inducción de estos genes tendría lugar a través de la activación de la ruta de activación de Ca^{2+} /calcineurina/NFAT. Esto se pone de manifiesto por el hecho de que agentes inductores de esta vía de forma independiente del receptor FP, como los ionóforos de Ca^{2+} junto con ésteres de forbol, promueven la inducción transcripcional de dichos genes, además de por el efecto inhibitorio de la CsA. La activación de NFAT por agonistas del receptor FP o por TPA + ionóforos de Ca^{2+} participaría también de forma evidente en la inducción de ciertos genes marcadores hipertróficos como β -MHC y ANP.

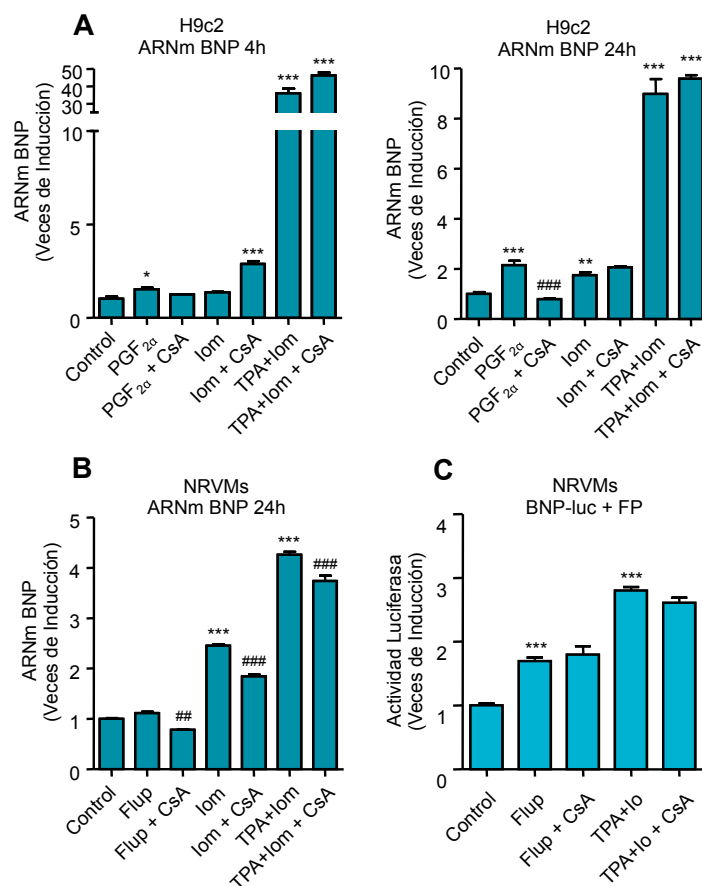


Figura 30. Efecto de los agonistas del receptor FP sobre la expresión de BNP en células H9c2 y en cardiomiocitos de rata. (A) Las células H9c2 fueron tratadas con PGF_{2α} (1 μM), lonomicina (0,5 μg/ml) o TPA + lonomicina (15 ng/ml + 0,5 μg/ml) durante 4 horas o 24 horas, en presencia o ausencia de CsA (100 ng/ml). (B) Los cardiomiocitos de ratas neonatas fueron tratados con el agonista del FP Fluprostenol (1 μM), con lonomicina (0,5 μg/ml) o con TPA + lonomicina (15 ng/ml + 0,5 μg/ml) durante 24 horas, en presencia o ausencia de CsA. En todos los casos se analizó mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real la expresión del ARNm de BNP. Se muestran las gráficas de experimentos representativos, con los datos representados como veces de inducción ± SD con respecto al control, y corregidos por la expresión del ARNr 18S. (C) Los cardiomiocitos de ratas neonatas fueron transfectados con un plásmido que contiene la región promotora del gen BNP (BNP-luc), junto con el plásmido de expresión del receptor FP, tras lo cual fueron tratados con Fluprostenol o con TPA + lonóforo (15 ng/ml + 0,5 μM) durante 4 horas, en presencia o ausencia de CsA. La actividad luciferasa está representada como veces de inducción ($RLU_{muestra}/RLU_{control}$) ± SD (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 respecto al control; ### p<0,001; ## p<0,01 respecto al mismo estímulo sin CsA).

DISCUSIÓN

1. Activación de la vía de señalización de Ca^{2+} /Calcineurina/NFAT por $\text{PGF}_{2\alpha}$

El principal objetivo de esta tesis doctoral ha sido el estudio de las acciones de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ y de las vías de señalización implicadas en sus efectos, en diferentes modelos experimentales. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la activación de la vía de señalización Ca^{2+} /calcineurina/NFAT tras la activación del receptor FP por sus ligandos, tanto en linfocitos T humanos como en cardiomiocitos de rata.

Las acciones de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ tienen lugar principalmente a través de la unión al receptor FP, cuya expresión ha sido descrita en diversos tejidos como los ovarios (Sugimoto et al, 1994), en endometrio (Milne & Jabbour, 2003), en el sistema nervioso central (principalmente en la médula espinal) (Suzuki-Yamamoto et al, 2009), en tejidos renales (Saito et al, 2003) y oculares (Schlotzer-Schrehardt et al, 2002), así como en osteoblastos (Sarrazin et al, 2001) o adipocitos (Serrero & Lepak, 1997). Son varias las evidencias que permiten afirmar que las acciones ejercidas por la $\text{PGF}_{2\alpha}$ en nuestros estudios tienen lugar a través del receptor FP. El estudio de la expresión de este receptor en células Jurkat y en cardiomiocitos y fibroblastos de ratas neonatas puso de manifiesto su presencia, aunque con diferentes niveles de expresión, en estos tipos celulares. Por otro lado, los efectos de análogos metabólicamente estables de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ con gran afinidad por el receptor FP como el Fluprostenol, fueron similares a los observados con la $\text{PGF}_{2\alpha}$. Es más, las acciones de estos agonistas fueron más evidentes tras la sobre-expresión del receptor FP, como en el caso de células Jurkat o H9c2. Aunque estos ligandos se unen al receptor FP con una afinidad 10 veces mayor que otros prostanoides no específicos, haciéndolos altamente selectivos para este receptor (Narumiya et al, 1999), estudiamos la posibilidad de que los efectos de los agonistas del FP tuvieran lugar a través de otros receptores de prostanoides como el EP1 y el EP4. Si bien observamos que la $\text{PGF}_{2\alpha}$ era capaz de presentar efectos similares a los observados con el receptor FP en cuanto a la activación de NFAT, en células que sobre-expresaban el receptor EP1, fueron en cualquier caso sustancialmente menores, sólo se observaron a las dosis mayores (1 μM) de esta prostaglandina, y en ningún caso el agonista selectivo Fluprostenol produjo un efecto significativo. En suma, estos resultados validarían el papel del receptor FP en las acciones ejercidas tanto por la $\text{PGF}_{2\alpha}$ como por el Fluprostenol en nuestros estudios.

El receptor FP pertenece a la familia de GPCRs, habiéndose descrito que se acopla principalmente a una proteína G α_q , activando la fosfolipasa C y dando lugar a la liberación de inositol-3-fosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG), con la consiguiente participación de segundos mensajeros como el Ca^{2+} y la activación de PKC (Milne & Jabbour, 2003). El receptor FP también es capaz de activar otras vías como la de la GTPasa Rho a través de la interacción con la proteína G12/13 (Pierce et al, 1999), o de activar la ruta de Raf/MEK/MAP quinasa de una forma alternativa al acoplarse con la proteína Gi (Bos et al, 2004; Melien et al, 1998; Ohmichi et al, 1997). Nuestros resultados indicarían que, tanto en linfocitos T como en cardiomiocitos, la señalización a través del FP tiene lugar mediante

la activación de una proteína Gαq, como se ha descrito en otros tipos celulares como los adipocitos (Liu & Clipstone, 2007) o las células de adenocarcinoma de endotelio (Wallace et al, 2011). El tratamiento con agonistas del FP indujo un incremento en la movilización de Ca²⁺ intracelular, tanto en las células Jurkat-FP como en cardiomiocitos, hecho que concuerda con resultados publicados en otros tipos celulares que relacionan la PGF_{2α} con la señalización mediada por Ca²⁺ a través del acoplamiento del FP a Gαq (Park et al, 2011; Skarra et al, 2011).

Así mismo, se ha descrito que la estimulación del receptor FP por parte de la PGF_{2α} desencadena cascadas de señalización que resultan en la activación de la vía de las MAPKs en distintos tipos celulares tales como en adenocarcinomas de endometrio (Chen et al, 1998; Sales et al, 2004) o en osteoclastos (Ahmed et al, 2003; Sabbieti et al, 2005). Nuestros resultados también indican una activación dependiente de PGF_{2α} de ERK1/2 y de JNK en cardiomiocitos, como ya se describiera para p38 en este mismo tipo celular (Hara et al, 2008).

Si bien se ha descrito en otros tipos celulares que la PGF_{2α} induce la expresión de genes por activación de la MAPK ERK1/2, el papel de NFAT no siempre se ha asociado con la señalización a través de PGF_{2α} – FP (Wallace et al, 2009). Nuestros resultados muestran que la señalización a través del receptor FP conlleva la activación de NFAT tanto en linfocitos T como en cardiomiocitos, como también se describiera en células epiteliales de adenocarcinoma de endometrio (Sales et al, 2009; Wallace et al, 2011). La relevancia de Gαq en la activación de NFAT por agonistas del FP se puso de manifiesto por los resultados que muestran la inducción de NFAT por PGF_{2α} tras la sobreexpresión de Gαq, y el efecto sinérgico que se observó en células co-transfectadas con vectores de expresión del FP y la Gαq. Además del FP, la señalización a través de otros GPCRs acoplados a Gαq promueve la activación de NFAT en diversos tipos celulares. Algunos ejemplos que demuestran la señalización a través de receptores acoplados a la proteína Gαq capaces de inducir la transcripción mediada por NFAT son los receptores H1 de histamina presentes en células endoteliales de cordón umbilical (HUVEC) (Boss et al, 1998b) donde NFAT media la transcripción de citoquinas como la IL-8 implicadas en la extravasación de células linfoides al endotelio, los receptores de trombina y angiotensina II (Boss et al, 1998a) o los receptores de nucleótidos (Abbott et al, 2000) presentes en células de músculo liso vasculares, así como los receptores muscarínicos presentes tanto en células PC12 de origen neuronal como en células linfoides (Boss et al, 1996). En este sentido, los resultados obtenidos en células que sobre-expresan los receptores de prostanoïdes EP1 y EP4, muestran la inducción de la activación dependiente de NFAT tras la activación por PGE₂ en el caso del receptor EP1, acoplado a Gαq, y no en el caso de EP4, asociado a una unidad Gas (Alfranca et al, 2006; Hirata & Narumiya, 2012; Narumiya & FitzGerald, 2001).

La activación de GPCRs se regula, entre otras maneras, por la acción de quinasas de estos receptores como la GRK2 (Penela et al, 2010; Penela et al, 2003; Premont & Gainetdinov, 2007). Los resultados obtenidos en células que sobre-expresan cantidades crecientes, bien de una forma silvestre de GRK2 o bien de un mutante catalíticamente

inactivo de la misma (GRK2 K220R), muestran un efecto inhibitor sobre la señalización de Gαq medido por sus efectos negativos sobre la activación de NFAT. Si bien son necesarias cantidades mayores del mutante quinasa GRK2K220R que del GRK2 silvestre para producir este efecto inhibitor, estos resultados indicarían que la GRK2 regularía de forma negativa la señalización mediada por los agonistas del FP, tanto en presencia como en ausencia de actividad quinasa. En este sentido, se ha descrito que la GRK2 puede regular negativamente la señalización mediada por Gαq, tanto por la fosforilación directa de GPCRs y su desensibilización, como por la interacción y secuestro de Gαq, impidiendo su señalización a través de efectores asociados a la misma (Carman et al, 1999; Day et al, 2003; Ribas et al, 2007).

La activación de NFAT viene medida por un aumento de Ca²⁺ intracelular y la consiguiente activación de la fosfatasa calcineurina, dependiente de Ca²⁺/calmodulina, la cual desfosforila el NFAT citoplásmico, lo que permite su paso al núcleo (Hogan et al, 2003; Li et al, 2011). El tratamiento con los agonistas del FP indujo la desfosforilación del factor de transcripción y su paso al núcleo en los tipos celulares estudiados. La participación de la calcineurina en la señalización mediada por el receptor FP se puso de manifiesto por el hecho de que la inducción de la activación de NFAT por los agonistas de este receptor fue inhibida con el tratamiento con CsA, inhibidor de la actividad fosfatasa de la calcineurina. Una vez en el núcleo, NFAT se une a elementos de respuesta en la región promotora de genes diana y, junto con la participación de otros factores de transcripción, regula su transcripción. Nuestros resultados muestran la inducción transcripcional dependiente de NFAT de diversos genes, tanto en células Jurkat como en cardiomiocitos.

2. Relevancia de las acciones de la PGF_{2α} en linfocitos T

Existen numerosos estudios que relacionan los compuestos de la familia de los prostanoïdes con la regulación de la respuesta inmune y la activación de los linfocitos T (Li et al, 2013; Rocca & FitzGerald, 2002; Sreeramkumar et al, 2012). En el contexto de una respuesta inmune o de un proceso inflamatorio, estos prostanoïdes pueden ser originados por diversos tipos celulares implicados, incluyendo células del sistema inmune como los macrófagos. Es interesante destacar que los propios linfocitos T son capaces de producir prostanoïdes que serían capaces de participar en la regulación de la respuesta inmune (Tanaka et al, 2000). Sin embargo, poco se conoce sobre los efectos particulares de la PGF_{2α} en este tipo celular, ya que las acciones de la PGF_{2α} se han descrito principalmente en el sistema reproductor femenino (Kobayashi & Narumiya, 2002), aunque también juega un papel importante en otros procesos como la migración leucocitaria (de Menezes et al, 2005), la función renal o la disfunción miocárdica (Ricciotti & FitzGerald, 2011). Resultados previos del laboratorio ponen de manifiesto la producción de niveles moderados de PGF_{2α} por linfocitos T activados (Cacheiro-Llaguno, 2010). Estos estudios, realizados en linfocitos T primarios de humano, mostraban un efecto inductor en la expresión de citoquinas tras el tratamiento con agonistas del receptor FP como la PGF_{2α} o el Fluprostenol. Como mostramos en esta tesis doctoral, en células Jurkat estos efectos son más evidentes

cuando se sobreexpresa el receptor FP. En este trabajo completamos dichos estudios, analizando la capacidad de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ de regular la expresión génica en células T a través del incremento del calcio intracelular, de la activación de calcineurina y de la transcripción dependiente del factor de transcripción NFAT. Los datos obtenidos muestran un papel relevante del acoplamiento del FP a la proteína G α q en la modulación de la expresión génica y de la activación del linfocito T por agonistas de este receptor. A este respecto, existen estudios que demuestran que la señalización a través de receptores acoplados a la proteína G α q puede jugar un importante papel en la activación de linfocitos T y en la respuesta inmune (Boss et al, 1996; Cenciarelli et al, 1992; Kumar et al, 2006; Ngai et al, 2008; Tsoukas et al, 2000).

En particular, nuestros resultados muestran que la $\text{PGF}_{2\alpha}$, en presencia del receptor FP, es capaz de promover la activación de NFAT, su translocación al núcleo, y la regulación de la expresión génica dependiente de NFAT en células Jurkat. En este tipo celular, los efectos producidos por la $\text{PGF}_{2\alpha}$ sobre la activación de NFAT fueron comparables a nivel cualitativo, si bien menores en la mayor parte de los casos, a los promovidos por el tratamiento combinado con el Éster de Forbol TPA, junto con el ionóforo de Ca^{2+} A23187, estímulos que mimetizan la inducción de las vías de señalización que se produce en el proceso de activación del linfocito T tras la unión del antígeno al TCR (Iniguez et al, 1999; Truneh et al, 1985). De tal manera, al igual que la estimulación por TPA+Io, la $\text{PGF}_{2\alpha}$ o el Fluprostenol, produjeron un aumento en la actividad transcripcional de genes como COX-2, IL-2 o RCAN-1, en cuya regulación NFAT juega un papel esencial (Iniguez et al, 2000; Oh et al, 2010; Walters et al, 2013).

En conjunto, los datos obtenidos acerca de las acciones de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ en células Jurkat indican un papel de esta prostaglandina en el control de la activación de los linfocitos T, a través de la activación del receptor FP y su asociación con una proteína G α q. Estos resultados aportan nuevas evidencias acerca del papel que la señalización a través de receptores acoplados a la proteína G α q pueda jugar en la activación de linfocitos T y en la respuesta inmune.

3. Relevancia de las acciones de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ en cardiomiocitos

Las enfermedades cardiovasculares son una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en los países desarrollados, siendo la hipertrofia cardiaca un factor de riesgo predictivo de fallo cardiaco (Rohini et al, 2010). Si bien los prostanoides son capaces de regular funciones relevantes en el corazón (Beamish et al, 1985; Mendez & LaPointe, 2002; Takayama et al, 2005), existen pocos estudios acerca de la regulación de la expresión de los enzimas responsables de su producción en tejido cardiaco. En cardiomiocitos, parece haber una expresión constitutiva de COX-1, mientras que la expresión de COX-2, ausente en el miocardio sano, se encuentra inducida en respuesta a isquemia y tras infarto de miocardio (Abbate et al, 2004; Shinmura et al, 2000; Wong et al, 1998). Estímulos inflamatorios como la IL-1 β , el TNF α y el LPS son también capaces de inducir la expresión de COX-2 en cardiomiocitos (Degousee et al, 2006; Degousee et al, 2003;

Giannico et al, 2005; Grandel et al, 2000; Liu et al, 1996; Peng et al, 2005). La expresión de COX-2 también se ha visto incrementada en el corazón de pacientes con cardiopatía dilatada (Wong et al, 1998). Por otro lado, ciertos prostanoideos parecen jugar un papel importante en la hipertrofia cardiaca. El crecimiento hipertrófico de los cardiomiocitos se inicia por factores endocrinos, paracrinos y autocrinos que estimulan una amplia variedad de receptores unidos a membrana, entre los que destacan aquellos unidos a proteínas G como los receptores de prostaglandinas (Frey & Olson, 2003). Tanto la PGE₂ como la PGF_{2α} se han visto involucradas en el fenómeno de hipertrofia cardiaca a través de sus acciones tras la unión a sus receptores en la membrana (Adams et al, 1998a; Kunapuli et al, 1998; Mendez & LaPointe, 2005). Dado que el uso de AINEs COX-2 selectivos incrementa el riesgo de daño cardiaco, ha crecido de forma notable el interés en el papel de la COX-2 y de los prostanoideos en la función cardiaca y su patología. Sin embargo, la función que ejerce la COX-2 en la fisiología y patología cardiaca es controvertida, de tal forma que se han descrito evidencias tanto a favor de un papel protector como en contra de este enzima en corazón en modelos experimentales (Abbate et al, 2004; Inserte et al, 2009; Streicher & Wang, 2008; Wang et al, 2009).

En el caso particular de la PGF_{2α}, se ha descrito que ésta puede desempeñar un papel importante en el desarrollo de hipertrofia cardiaca, modulando la síntesis de proteínas y el crecimiento de los cardiomiocitos (Adams et al, 1996; Kunapuli et al, 1998; Lai et al, 1996). En este trabajo hemos comprobado que, la activación tras el tratamiento con agonistas del receptor FP, acoplado éste a Gαq, promueve la activación de vías de señalización intracelulares que tienen como resultado la activación de MAPKs, así como la activación de la transcripción dependiente de NFAT.

Los GPCRs activan varias rutas de señalización intracelular involucradas en la fisiopatología del fallo cardiaco (Adams et al, 1998b; Akhter et al, 1998; Esposito et al, 2002; Fan et al, 2005; Heineke & Molkenin, 2006). Entre éstas se incluye la vía de activación de MAPKs como ERK, JNK y p38, las cuales participan como intermediarios clave en la generación de hipertrofia cardiaca (Choukroun et al, 1998; Glennon et al, 1996; Sugden & Clerk, 1998). Nuestros resultados muestran un aumento de la fosforilación de ERK y de JNK en respuesta a ligandos del FP en células cardiacas, lo que confirma la potencial implicación de la PGF_{2α} en el desarrollo de esta patología.

Además de las MAPKs, la activación de la vía de señalización de Ca²⁺/ Calcineurina/ NFAT ha sido ampliamente descrita como un mediador clave en el desarrollo de hipertrofia cardiaca (Bueno et al, 2002a; Bueno et al, 2002b; Molkenin et al, 1998). En esta tesis hemos analizado en detalle el papel de la PGF_{2α} sobre la vía Calcineurina/NFAT en cardiomiocitos, poniendo de manifiesto la relación existente entre su activación por agonistas del receptor FP y sus implicaciones en la regulación la expresión génica en la hipertrofia. La activación de NFAT en cardiomiocitos fue dependiente de la presencia de receptor FP, de Gαq y de la actividad calcineurina como reflejan los experimentos de co-transfección con el receptor FP, la proteína Gαq y la inhibición de calcineurina con CsA. Es interesante reflejar el papel esencial del Ca²⁺ en estos procesos, observándose que, al igual que la activación de un

GPCR acoplado a Gαq como el FP, el tratamiento con ionóforos de Ca²⁺ es capaz de promover la activación de NFAT y la inducción de la transcripción dependiente de este factor de transcripción, tanto en la línea celular H9c2 como en cardiomiocitos neonatales de rata.

Los estudios con modelos transgénicos y *knockouts* específicos de las distintas isoformas de NFAT han puesto de manifiesto el papel diferencial que puede jugar cada una de las distintas isoformas de NFAT. Atendiendo a sus acciones en la fisiopatología cardiovascular, se ha descrito que la eliminación de NFATc1 es letal durante la fase embrionaria debido a defectos en la morfogénesis cardíaca y la formación de las válvulas (de la Pompa et al, 1998; Ranger et al, 1998). Por otro lado, se ha descrito que NFATc2 es necesario para el desarrollo de la hipertrofia dependiente de calcineurina (Bourajjaj et al, 2008). Así mismo, mientras que los ratones carentes de NFATc3 experimentan una reducción significativa en el desarrollo de hipertrofia (Wilkins et al, 2002), en el caso de NFATc4, a pesar de que su sobreexpresión es suficiente para generar hipertrofia cardíaca (Molkentin et al, 1998), la pérdida de esta isoforma no compromete la habilidad del miocardio para desarrollar un crecimiento hipertrófico (van Rooij et al, 2002; Wilkins et al, 2002).

El análisis de la expresión de las diferentes isoformas de NFATc1-c4 en nuestros modelos celulares, reveló una expresión diferencial de las mismas en células cardíacas, con un papel relevante de las isoformas NFATc3 y NFATc4 (Bourajjaj et al, 2008; Pu et al, 2003; van Rooij et al, 2002). Tanto la PGF_{2α} como el Fluprostenol fueron capaces de inducir la desfosforilación de NFATc3 y NFATc4, y su translocación al núcleo. Si bien en el caso de NFATc3 no se observó una translocación al núcleo estadísticamente significativa, el tratamiento con PGF_{2α}, Ionomicina y TPA + Ionomicina eliminaron su presencia en el citoplasma de células H9c2, a pesar de ser una isoforma altamente influenciada por procesos de exportación nuclear (Rinne & Blatter, 2010; Rinne et al, 2010)

Nuestros resultados definen una ruta intracelular para la inducción de la hipertrofia cardíaca por PGF_{2α} que une la señalización por Ca²⁺ en el citoplasma con cambios en la expresión de genes dependientes de NFAT como COX-2, RCAN-1, β-MHC o ANP en cardiomiocitos.

El tratamiento con agonistas del receptor FP, al igual que la combinación de TPA + Ionóforo de Ca²⁺ indujo la expresión temprana de COX-2 en cardiomiocitos. Evidencias cada vez más numerosas demuestran que COX-2 juega un papel importante en las enfermedades cardiovasculares como la aterosclerosis (Cipollone et al, 2008), el infarto y la isquemia miocárdica (Ferdinandy et al, 2007), así como el fallo cardíaco (Delgado et al, 2004). Los primeros estudios mostraban que COX-2 se expresaba abundantemente en el corazón infartado de humanos (Wong et al, 1998). El desarrollo de ratones transgénicos que sobre-expresan COX-2 en corazón ha permitido demostrar que la inducción *in vivo* de COX-2 es suficiente para inducir una hipertrofia compensatoria y un remodelamiento cardíaco (Streicher et al, 2010). Por otro lado, los inhibidores selectivos de COX-2 rofecoxib y celecoxib pueden atenuar la hipertrofia y la fibrosis inducida por angiotensina II y

aldosterona (Wang et al, 2010; Wu et al, 2005). Todos estos datos sugieren que la COX-2 podría ser un factor importante en el desarrollo de hipertrofia cardiaca.

Dependiendo del estímulo y del tipo celular, la expresión de COX-2 se encuentra regulada por diferentes factores de transcripción, incluyendo CREBP, AP-1, C/EBP, NF- κ B, y NFAT, entre otros (Íñiguez *et al.*, 2000; Tanabe y Tohnai, 2002; Vila-del Sol y Fresno, 2005). La implicación de NFAT en la regulación de COX-2 ha sido demostrada en linfocitos T, células de carcinoma de colon y en células del endotelio vascular entre otros tipos celulares (Duque *et al.*, 2005; Hernández *et al.*, 2001; Íñiguez *et al.*, 2000). Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral muestran el papel de NFAT en la regulación de COX-2 en cardiomiocitos en respuesta a la activación de la vía de señalización de Ca²⁺/calcineurina ya fuera por agonistas del receptor FP o por el tratamiento con ionóforos de Ca²⁺ en combinación con TPA. En la inducción transcripcional de COX-2 participan los sitios NFAT distal y proximal previamente descritos en la región promotora del gen COX-2 (Iniguez et al, 2000). El aumento en los niveles de COX-2 se corresponde con un incremento en la producción de prostanoïdes como la PGE₂ o la propia PGF_{2 α} que podrían ejercer una acción autocrina sobre los cardiomiocitos.

RCAN1.4. es otro de los genes expresados en cardiomiocitos y dependientes de NFAT que se vieron inducidos en respuesta a agonistas del FP. RCAN es una familia de proteínas formada por tres miembros que regulan la actividad de la fosfatasa calcineurina. RCAN1 es el miembro más abundante y mejor caracterizado hasta el momento. Su gen puede transcribirse en cuatro isoformas diferentes. La transcripción de las isoformas RCAN1.1-3 está controlada por el mismo promotor localizado en el extremo 5' del gen, sin embargo, la transcripción de la isoforma RCAN1.4 está controlada por un promotor interno localizado en el intrón 3. A nivel de proteína se han detectado y estudiado principalmente las isoformas RCAN1.1 y RCAN1.4. Mientras que RCAN1.1 es un gen de expresión constitutiva, RCAN1.4 es un gen inducible cuyo promotor está regulado a través de la vía de señalización de Ca²⁺/ Calcineurina/NFAT, con al menos 15 sitios de unión de este factor (Davies et al, 2007). Por lo tanto, la expresión de RCAN1.4 supone un mecanismo de autorregulación por retroalimentación negativa de la ruta de señalización de Calcineurina/NFAT. Se ha implicado a RCAN1 en importantes procesos fisiopatológicos como la angiogénesis y el crecimiento tumoral, la memoria y la plasticidad sináptica o la función de mastocitos y células T (Baek et al, 2009; Canellada et al, 2008; Harris et al, 2005; Hoeffler et al, 2007; Ryeom et al, 2008; Yang et al, 2009), así como en patologías cardiovasculares como la aterosclerosis (Esteban et al, 2011; Mendez-Barbero et al, 2013) o la hipertrofia cardiaca. En el caso de la hipertrofia, se han llevado a cabo tanto ensayos de sobreexpresión de RCAN1 (Rothermel et al, 2001) como de modelos *knockout* RCAN1^{-/-} (Vega et al, 2003) que muestran el papel de RCAN1 en la prevención de hipertrofia cardiaca inducida por Calcineurina. Se ha propuesto que, al interaccionar e inhibir a la Calcineurina, RCAN1 puede prevenir la translocación de NFAT al núcleo y evitar sus funciones en la inducción transcripcional, previniendo así la hipertrofia (Harris et al, 2005). Nuestros resultados muestran la implicación de NFAT en la regulación de RCAN1 por el tratamiento tanto con

agonistas del receptor FP como con el tratamiento combinado de ionóforos de Ca^{2+} con TPA.

Otro de los genes cuya expresión se encuentra regulada por $\text{PGF}_{2\alpha}$ en nuestros estudios es el gen de la cadena pesada de la miosina (β -MHC o Myh7). Los cambios en la proporción de las isoformas cardíacas de la cadena pesada de la miosina parecen estar relacionados directamente con la velocidad de contracción del corazón (Swynghedauw, 1986). La regulación transcripcional de las isoformas α -MHC y β -MHC a lo largo del desarrollo está regulada de forma coordinada por la hormona tiroidea, de manera que su unión a un elemento de respuesta TRE (*thyroid hormone-responsive element*) localizado en el promotor proximal del gen de la α -MHC (Myh6) regula positivamente su expresión tras el nacimiento, mientras que el TRE del gen de la β -MHC regula de forma negativa la expresión de este gen (Kuwahara et al, 2012). En condiciones patológicas del corazón sin embargo, la expresión de β -MHC parece estar regulada en parte por la acción conjunta de los factores de transcripción NFAT y GATA4, que estimulan la expresión del gen Myh7 al unirse a su región promotora (Kuwahara et al, 2006; Molkentin et al, 1998). Nuestros datos indican al menos un papel de NFAT en la regulación de la expresión de β -MHC tras la estimulación tanto con agonistas del FP como con ionóforos de Ca^{2+} activadores de la vía de Calcineurina/NFAT. La inducción de esta isoforma, menos eficiente en su actividad ATPasa, es uno de los eventos que se utiliza como marcador de hipertrofia.

Por otro lado, los resultados obtenidos acerca de la expresión de los genes de los péptidos natriuréticos ANP y BNP en cardiomiocitos muestran diferencias esenciales en cuanto a su regulación por agonistas del receptor FP. La inducción de la expresión de estos genes es considerada como un marcador de hipertrofia cardíaca (Rohini et al, 2010). Nuestros resultados muestran tanto una inducción de la expresión de ANP como su activación transcripcional tras el tratamiento con los agonistas del receptor FP a través de la vía de Calcineurina/NFAT. Diversos estudios han puesto de manifiesto la contribución de varios factores de transcripción en la regulación transcripcional de ANP en células cardíacas como SRF, NKX2.5, Tbx5, GATA4/6, MEF2C o Zfp260, (Nishikimi et al, 2011). Además, fuera de la región proximal existen otras secuencias que regulan la inducción de ANP, como son los elementos NRSE (*neuron-restrictive silencer element*), HRE (*hypoxia-response element*) y GRE (*glucocorticoid responsive element*) (Houweling et al, 2005; Kuwahara et al, 2003). También existe un sitio conservado de unión para NFAT en el promotor de ANP, al que se ha descrito que la isoforma NFATc4 se une tras el tratamiento con leptina (Mascareno et al, 2009).

En el caso de BNP, los resultados obtenidos indicarían que, si bien su expresión se induce por el tratamiento con TPA+I_o, no cambia de forma notable en respuesta a $\text{PGF}_{2\alpha}$ ni se ve reducido en ningún caso de forma significativa por CsA. Para BNP, en humanos, se han identificado elementos de unión a factores de transcripción como los sitios GATA, M-CAT y AP-1/CRE, que están conservados en humanos, ratas y ratones (Kuwahara & Nakao, 2010). Otros elementos localizados en regiones más distales del promotor incluyen elementos NRSE, SSRE (*shear stress-responsive elements*), TRE o NFAT (Nishikimi et al,

2011). A su vez, se ha descrito que NFATc4 y GATA4 activan sinérgicamente el gen BNP en cardiomiocitos (Molkentin et al, 1998; van Rooij et al, 2002). De tal manera, si bien nuestros resultados indicarían que la $PGF_{2\alpha}$ es capaz de promover la activación de NFATc4, no tenemos constancia del efecto de ésta sobre GATA4, lo que sugeriría que este efecto sería insuficiente para la activación de BNP. La inducción de BNP por el tratamiento combinado con TPA + Ion se podría explicar por el hecho de que este estímulo activaría tanto NFAT, a través de la señalización por Ca^{2+} , como GATA4, mediante la activación de PKC (Wang et al, 2005).

En resumen, los resultados obtenidos acerca del efecto de los ligandos agonistas del receptor FP en cardiomiocitos, permiten afirmar que la activación de la vía de señalización de Ca^{2+} /Calcineurina a través de $G_{\alpha q}$ produce un incremento en la inducción de la expresión de genes dependientes de NFAT, entre los que se encuentran COX-2, ANP y MyH7, con importantes implicaciones en la fisiología cardíaca y en particular en el desarrollo de la patología hipertrófica (Figura D1).

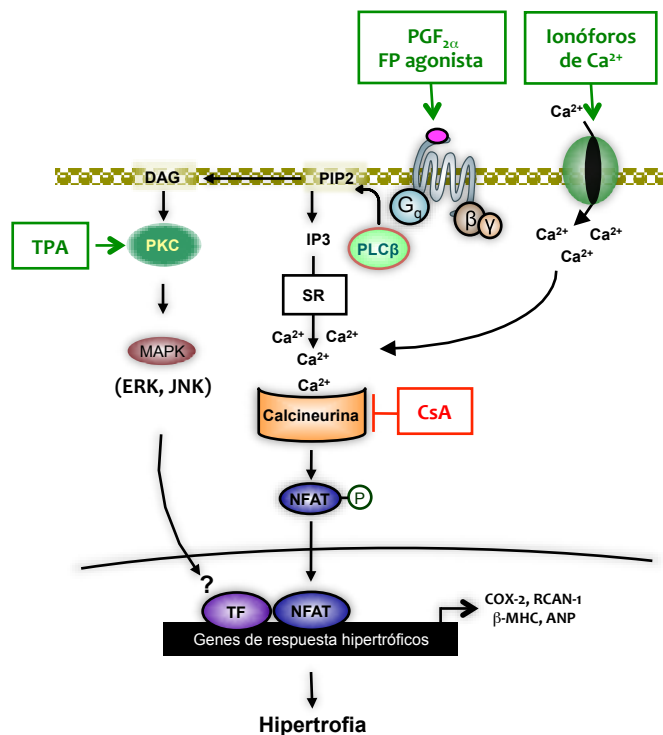


Fig. D1: Modelo de señalización de la $PGF_{2\alpha}$ en hipertrofia cardíaca patológica. Los agonistas del receptor FP desencadenan la activación de una proteína $G_{\alpha q}$. El efector clásico de los GPCRs acoplados a proteínas $G_{\alpha q}$ en corazón es la fosfolipasa C- β ($PLC\beta$), responsable de la hidrólisis y liberación de los segundos mensajeros inositol-3-fosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG). El DAG formado facilita la activación de la proteína quinasa C (PKC) que a su vez activa las quinasas de proteínas activadas por mitógenos (MAPKs). Los agonistas del FP activan al menos ERK y JNK. Las distintas MAPKs tienen diferente grado de implicación en la hipertrofia cardíaca, activando distintos factores de transcripción responsables

de la expresión de genes de respuesta hipertrófica. Por otro lado, los agonistas del receptor FP son capaces de, a través del IP_3 , inducir la liberación de Ca^{2+} al citoplasma y activar la fosfatasa sensible a ciclosporina (CsA) Calcineurina, que desfosforila a NFAT permitiendo la entrada de este factor de transcripción al núcleo y la activación transcripcional de genes de respuesta hipertrófica. La señalización por agonistas del FP se puede simular utilizando ionóforos de Ca^{2+} y activadores de la PKC como el TPA.

CONCLUSIONES

1. Los agonistas del receptor FP, como la $\text{PGF}_{2\alpha}$ o el Fluprostenol, inducen la activación de la ruta de señalización de Calcio/Calcineurina/NFAT en la línea celular humana tipo T Jurkat, así como en cardiomiocitos de ratas neonatas y en la línea celular H9c2 de mioblastos de rata.
2. La activación del factor de transcripción NFAT por $\text{PGF}_{2\alpha}$ o Fluprostenol en estas células está mediada por la señalización de estos agonistas a través del receptor FP, el cual se acopla a una proteína G α q.
3. El tratamiento con agonistas del receptor FP promueve la translocación de NFATc2 al núcleo en células Jurkat.
4. La activación de NFAT en células Jurkat por los agonistas del receptor FP induce la transcripción de genes implicados en la activación del linfocito T como la IL-2, en inflamación como COX-2, o en la propia regulación del factor de transcripción NFAT como RCAN-1.
5. El tratamiento con agonistas del receptor FP induce hipertrofia en cardiomiocitos primarios de ratas neonatas.
6. Tanto la $\text{PGF}_{2\alpha}$ como el Fluprostenol promueven la desfosforilación y translocación al núcleo de NFATc3 y NFATc4, así como la actividad transcripcional mediada por NFAT, tanto en células H9c2 como en cardiomiocitos primarios.
7. La activación de NFAT por agonistas del receptor FP en cardiomiocitos induce la expresión de genes tales como COX-2, RCAN-1 y marcadores hipertróficos como la cadena pesada de la miosina (β -MHC) o el péptido natriurético ANP y, en menor medida, el péptido natriurético BNP.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbate A, Santini D, Biondi-Zoccai GG, Scarpa S, Vasaturo F, Liuzzo G, Bussani R, Silvestri F, Baldi F, Crea F, Biasucci LM, Baldi A (2004) Cyclo-oxygenase-2 (COX-2) expression at the site of recent myocardial infarction: friend or foe? *Heart* **90**: 440-443
- Abbott KL, Loss JR, 2nd, Robida AM, Murphy TJ (2000) Evidence that Galpha(q)-coupled receptor-induced interleukin-6 mRNA in vascular smooth muscle cells involves the nuclear factor of activated T cells. *Molecular pharmacology* **58**: 946-953
- Adams JW, Migita DS, Yu MK, Young R, Hellickson MS, Castro-Vargas FE, Domingo JD, Lee PH, Bui JS, Henderson SA (1996) Prostaglandin F2 alpha stimulates hypertrophic growth of cultured neonatal rat ventricular myocytes. *The Journal of biological chemistry* **271**: 1179-1186
- Adams JW, Sah VP, Henderson SA, Brown JH (1998a) Tyrosine kinase and c-Jun NH2-terminal kinase mediate hypertrophic responses to prostaglandin F2alpha in cultured neonatal rat ventricular myocytes. *Circulation research* **83**: 167-178
- Adams JW, Sakata Y, Davis MG, Sah VP, Wang Y, Liggett SB, Chien KR, Brown JH, Dorn GW, 2nd (1998b) Enhanced Galphaq signaling: a common pathway mediates cardiac hypertrophy and apoptotic heart failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 10140-10145
- Ahmed I, Gesty-Palmer D, Drezner MK, Luttrell LM (2003) Transactivation of the epidermal growth factor receptor mediates parathyroid hormone and prostaglandin F2 alpha-stimulated mitogen-activated protein kinase activation in cultured transgenic murine osteoblasts. *Mol Endocrinol* **17**: 1607-1621
- Aid S, Bosetti F (2011) Targeting cyclooxygenases-1 and -2 in neuroinflammation: Therapeutic implications. *Biochimie* **93**: 46-51
- Akaogi J, Nozaki T, Satoh M, Yamada H (2006) Role of PGE2 and EP receptors in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and as a novel therapeutic strategy. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* **6**: 383-394
- Akhter SA, Luttrell LM, Rockman HA, Iaccarino G, Lefkowitz RJ, Koch WJ (1998) Targeting the receptor-Gq interface to inhibit in vivo pressure overload myocardial hypertrophy. *Science* **280**: 574-577
- Alberini CM (2009) Transcription factors in long-term memory and synaptic plasticity. *Physiol Rev* **89**: 121-145
- Alfranca A, Iniguez MA, Fresno M, Redondo JM (2006) Prostanoid signal transduction and gene expression in the endothelium: role in cardiovascular diseases. *Cardiovascular research* **70**: 446-456
- Alioua A, Tanaka Y, Wallner M, Hofmann F, Ruth P, Meera P, Toro L (1998) The large conductance, voltage-dependent, and calcium-sensitive K⁺ channel, Hslo, is a target of cGMP-dependent protein kinase phosphorylation in vivo. *The Journal of biological chemistry* **273**: 32950-32956
- Altman A, Coggeshall KM, Mustelin T (1990) Molecular events mediating T cell activation. *Adv Immunol* **48**: 227-360
- Baek KH, Zaslavsky A, Lynch RC, Britt C, Okada Y, Siarey RJ, Lensch MW, Park IH, Yoon SS, Minami T, Korenberg JR, Folkman J, Daley GQ, Aird WC, Galdzicki Z, Ryeom S (2009) Down's syndrome suppression of tumour growth and the role of the calcineurin inhibitor DSCR1. *Nature* **459**: 1126-1130
- Bai S, Kerppola TK (2011) Opposing roles of FoxP1 and Nfat3 in transcriptional control of cardiomyocyte hypertrophy. *Molecular and cellular biology* **31**: 3068-3080
- Basu S (2007) Novel cyclooxygenase-catalyzed bioactive prostaglandin F2alpha from physiology to new principles in inflammation. *Medicinal research reviews* **27**: 435-468

- Basu S (2010) Bioactive eicosanoids: role of prostaglandin F(2alpha) and F(2)-isoprostanes in inflammation and oxidative stress related pathology. *Mol Cells* **30**: 383-391
- Beamish RE, Das PK, Karmazyn M, Dhalla NS (1985) Prostaglandins and heart disease. *Can J Cardiol* **1**: 66-74
- Belmont PJ, Tadimalla A, Chen WJ, Martindale JJ, Thuerauf DJ, Marcinko M, Gude N, Sussman MA, Glembotski CC (2008) Coordination of growth and endoplasmic reticulum stress signaling by regulator of calcineurin 1 (RCAN1), a novel ATF6-inducible gene. *The Journal of biological chemistry* **283**: 14012-14021
- Belton O, Fitzgerald D (2003) Cyclooxygenase-2 inhibitors and atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* **41**: 1820-1822
- Benovic JL, DeBlasi A, Stone WC, Caron MG, Lefkowitz RJ (1989) Beta-adrenergic receptor kinase: primary structure delineates a multigene family. *Science* **246**: 235-240
- Berridge MJ (1997) Lymphocyte activation in health and disease. *Crit Rev Immunol* **17**: 155-178
- Blanco JC, Contursi C, Salkowski CA, DeWitt DL, Ozato K, Vogel SN (2000) Interferon regulatory factor (IRF)-1 and IRF-2 regulate interferon gamma-dependent cyclooxygenase 2 expression. *J Exp Med* **191**: 2131-2144
- Boniface K, Bak-Jensen KS, Li Y, Blumenschein WM, McGeachy MJ, McClanahan TK, McKenzie BS, Kastelein RA, Cua DJ, de Waal Malefyt R (2009) Prostaglandin E2 regulates Th17 cell differentiation and function through cyclic AMP and EP2/EP4 receptor signaling. *J Exp Med* **206**: 535-548
- Bos CL, Richel DJ, Ritsema T, Peppelenbosch MP, Versteeg HH (2004) Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction. *Int J Biochem Cell Biol* **36**: 1187-1205
- Boss V, Abbott KL, Wang XF, Pavlath GK, Murphy TJ (1998a) The cyclosporin A-sensitive nuclear factor of activated T cells (NFAT) proteins are expressed in vascular smooth muscle cells. Differential localization of NFAT isoforms and induction of NFAT-mediated transcription by phospholipase C-coupled cell surface receptors. *The Journal of biological chemistry* **273**: 19664-19671
- Boss V, Talpade DJ, Murphy TJ (1996) Induction of NFAT-mediated transcription by Gq-coupled receptors in lymphoid and non-lymphoid cells. *The Journal of biological chemistry* **271**: 10429-10432
- Boss V, Wang X, Koppelman LF, Xu K, Murphy TJ (1998b) Histamine induces nuclear factor of activated T cell-mediated transcription and cyclosporin A-sensitive interleukin-8 mRNA expression in human umbilical vein endothelial cells. *Molecular pharmacology* **54**: 264-272
- Boswell MG, Zhou W, Newcomb DC, Peebles RS, Jr. (2011) PGI2 as a regulator of CD4+ subset differentiation and function. *Prostaglandins & other lipid mediators* **96**: 21-26
- Bourajjaj M, Armand AS, da Costa Martins PA, Weijts B, van der Nagel R, Heeneman S, Wehrens XH, De Windt LJ (2008) NFATc2 is a necessary mediator of calcineurin-dependent cardiac hypertrophy and heart failure. *The Journal of biological chemistry* **283**: 22295-22303
- Brancaccio M, Hirsch E, Notte A, Selvetella G, Lembo G, Tarone G (2006) Integrin signalling: the tug-of-war in heart hypertrophy. *Cardiovascular research* **70**: 422-433
- Breyer RM, Bagdassarian CK, Myers SA, Breyer MD (2001) Prostanoid receptors: subtypes and signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41**: 661-690
- Bueno OF, Molkentin JD (2002) Involvement of extracellular signal-regulated kinases 1/2 in cardiac hypertrophy and cell death. *Circulation research* **91**: 776-781
- Bueno OF, van Rooij E, Molkentin JD, Doevendans PA, De Windt LJ (2002a) Calcineurin and hypertrophic heart disease: novel insights and remaining questions. *Cardiovascular research* **53**: 806-821

- Bueno OF, Wilkins BJ, Tymitz KM, Glascock BJ, Kimball TF, Lorenz JN, Molkentin JD (2002b) Impaired cardiac hypertrophic response in Calcineurin Abeta⁻deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 4586-4591
- Bunney TD, Katan M (2011) PLC regulation: emerging pictures for molecular mechanisms. *Trends Biochem Sci* **36**: 88-96
- Bunting S, Moncada S, Vane JR (1983) The prostacyclin--thromboxane A₂ balance: pathophysiological and therapeutic implications. *Br Med Bull* **39**: 271-276
- Burleigh ME, Babaev VR, Oates JA, Harris RC, Gautam S, Riendeau D, Marnett LJ, Morrow JD, Fazio S, Linton MF (2002) Cyclooxygenase-2 promotes early atherosclerotic lesion formation in LDL receptor-deficient mice. *Circulation* **105**: 1816-1823
- Cacheiro-Llaguno C (2010) Estudio de las acciones de la prostaglandina F₂ alfa y de los glucocorticoides sobre la activación de linfocitos T. Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Universidad Autónoma de Madrid,
- Caldwell B, Aldington S, Weatherall M, Shirtcliffe P, Beasley R (2006) Risk of cardiovascular events and celecoxib: a systematic review and meta-analysis. *J R Soc Med* **99**: 132-140
- Canellada A, Ramirez BG, Minami T, Redondo JM, Cano E (2008) Calcium/calcineurin signaling in primary cortical astrocyte cultures: Rcan1-4 and cyclooxygenase-2 as NFAT target genes. *Glia* **56**: 709-722
- 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. *The Journal of biological chemistry* **280**: 29435-29443
- Carman CV, Parent JL, Day PW, Pronin AN, Sternweis PM, Wedegaertner PB, Gilman AG, Benovic JL, Kozasa T (1999) Selective regulation of Gα_q(q11) by an RGS domain in the G protein-coupled receptor kinase, GRK2. *The Journal of biological chemistry* **274**: 34483-34492
- Carreno JE, Apablaza F, Ocaranza MP, Jalil JE (2006) [Cardiac hypertrophy: molecular and cellular events]. *Rev Esp Cardiol* **59**: 473-486
- Cenciarelli C, Hohman RJ, Atkinson TP, Gusovsky F, Weissman AM (1992) Evidence for GTP-binding protein involvement in the tyrosine phosphorylation of the T cell receptor zeta chain. *The Journal of biological chemistry* **267**: 14527-14530
- Chambers CA, Allison JP (1997) Co-stimulation in T cell responses. *Curr Opin Immunol* **9**: 396-404
- Chen D, Fong HW, Davis JS (2001) Induction of c-fos and c-jun messenger ribonucleic acid expression by prostaglandin F₂α is mediated by a protein kinase C-dependent extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathway in bovine luteal cells. *Endocrinology* **142**: 887-895
- Chen DB, Westfall SD, Fong HW, Roberson MS, Davis JS (1998) Prostaglandin F₂α stimulates the Raf/MEK1/mitogen-activated protein kinase signaling cascade in bovine luteal cells. *Endocrinology* **139**: 3876-3885
- Cheng Y, Austin SC, Rocca B, Koller BH, Coffman TM, Grosser T, Lawson JA, FitzGerald GA (2002) Role of prostacyclin in the cardiovascular response to thromboxane A₂. *Science* **296**: 539-541
- Chizzolini C, Chicheportiche R, Alvarez M, de Rham C, Roux-Lombard P, Ferrari-Lacraz S, Dayer JM (2008) Prostaglandin E₂ synergistically with interleukin-23 favors human Th17 expansion. *Blood* **112**: 3696-3703
- Choukroun G, Hajjar R, Fry S, del Monte F, Haq S, Guerrero JL, Picard M, Rosenzweig A, Force T (1999) Regulation of cardiac hypertrophy in vivo by the stress-activated protein kinases/c-Jun NH₂-terminal kinases. *The Journal of clinical investigation* **104**: 391-398

- Choukroun G, Hajjar R, Kyriakis JM, Bonventre JV, Rosenzweig A, Force T (1998) Role of the stress-activated protein kinases in endothelin-induced cardiomyocyte hypertrophy. *The Journal of clinical investigation* **102**: 1311-1320
- Chow CW, Rincon M, Cavanagh J, Dickens M, Davis RJ (1997) Nuclear accumulation of NFAT4 opposed by the JNK signal transduction pathway. *Science* **278**: 1638-1641
- Cipollone F, Cicolini G, Bucci M (2008) Cyclooxygenase and prostaglandin synthases in atherosclerosis: recent insights and future perspectives. *Pharmacol Ther* **118**: 161-180
- Cipollone F, Fazia M, Iezzi A, Ciabattini G, Pini B, Cucurullo C, Uchino S, Spigonardo F, De Luca M, Prontera C, Chiarelli F, Cucurullo F, Mezzetti A (2004) Balance between PGD synthase and PGE synthase is a major determinant of atherosclerotic plaque instability in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**: 1259-1265
- Corral RS, Iniguez MA, Duque J, Lopez-Perez R, Fresno M (2007) Bombesin induces cyclooxygenase-2 expression through the activation of the nuclear factor of activated T cells and enhances cell migration in Caco-2 colon carcinoma cells. *Oncogene* **26**: 958-969
- Coruzzi G, Venturi N, Spaggiari S (2007) Gastrointestinal safety of novel nonsteroidal antiinflammatory drugs: selective COX-2 inhibitors and beyond. *Acta Biomed* **78**: 96-110
- D'Angelo DD, Sakata Y, Lorenz JN, Boivin GP, Walsh RA, Liggett SB, Dorn GW, 2nd (1997) Transgenic Galphaq overexpression induces cardiac contractile failure in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 8121-8126
- Daniels LB, Maisel AS (2007) Natriuretic peptides. *J Am Coll Cardiol* **50**: 2357-2368
- Davidge ST (2001) Prostaglandin H synthase and vascular function. *Circulation research* **89**: 650-660
- Davies KJ, Ermak G, Rothermel BA, Pritchard M, Heitman J, Ahnn J, Henrique-Silva F, Crawford D, Canaider S, Strippoli P, Carinci P, Min KT, Fox DS, Cunningham KW, Bassel-Duby R, Olson EN, Zhang Z, Williams RS, Gerber HP, Perez-Riba M, Seo H, Cao X, Klee CB, Redondo JM, Maltais LJ, Bruford EA, Povey S, Molkentin JD, McKeon FD, Duh EJ, Crabtree GR, Cyert MS, de la Luna S, Estivill X (2007) Renaming the DSCR1/Adapt78 gene family as RCAN: regulators of calcineurin. *FASEB J* **21**: 3023-3028
- Day PW, Carman CV, Sterne-Marr R, Benovic JL, Wedegaertner PB (2003) Differential interaction of GRK2 with members of the G alpha q family. *Biochemistry* **42**: 9176-9184
- De Boer ML, Mordvinov VA, Thomas MA, Sanderson CJ (1999) Role of nuclear factor of activated T cells (NFAT) in the expression of interleukin-5 and other cytokines involved in the regulation of hemopoietic cells. *Int J Biochem Cell Biol* **31**: 1221-1236
- de la Pompa JL, Timmerman LA, Takimoto H, Yoshida H, Elia AJ, Samper E, Potter J, Wakeham A, Marengere L, Langille BL, Crabtree GR, Mak TW (1998) Role of the NF-ATc transcription factor in morphogenesis of cardiac valves and septum. *Nature* **392**: 182-186
- de Menezes GB, dos Reis WG, Santos JM, Duarte ID, de Francischi JN (2005) Inhibition of prostaglandin F(2alpha) by selective cyclooxygenase 2 inhibitors accounts for reduced rat leukocyte migration. *Inflammation* **29**: 163-169
- De Windt LJ, Lim HW, Bueno OF, Liang Q, Delling U, Braz JC, Glascock BJ, Kimball TF, del Monte F, Hajjar RJ, Molkentin JD (2001) Targeted inhibition of calcineurin attenuates cardiac hypertrophy in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 3322-3327

- Degousee N, Angoulvant D, Fazel S, Stefanski E, Saha S, Iliescu K, Lindsay TF, Fish JE, Marsden PA, Li RK, Audoly LP, Jakobsson PJ, Rubin BB (2006) c-Jun N-terminal kinase-mediated stabilization of microsomal prostaglandin E2 synthase-1 mRNA regulates delayed microsomal prostaglandin E2 synthase-1 expression and prostaglandin E2 biosynthesis by cardiomyocytes. *J Biol Chem* **281**: 16443-16452
- Degousee N, Martindale J, Stefanski E, Cieslak M, Lindsay TF, Fish JE, Marsden PA, Thuerlauf DJ, Glembotski CC, Rubin BB (2003) MAP kinase kinase 6-p38 MAP kinase signaling cascade regulates cyclooxygenase-2 expression in cardiac myocytes in vitro and in vivo. *Circ Res* **92**: 757-764
- Delgado RM, 3rd, Nawar MA, Zewail AM, Kar B, Vaughn WK, Wu KK, Aleksic N, Sivasubramanian N, McKay K, Mann DL, Willerson JT (2004) Cyclooxygenase-2 inhibitor treatment improves left ventricular function and mortality in a murine model of doxorubicin-induced heart failure. *Circulation* **109**: 1428-1433
- Diaz-Cazorla M, Perez-Sala D, Ros J, Jimenez W, Fresno M, Lamas S (1999) Regulation of cyclooxygenase-2 expression in human mesangial cells--transcriptional inhibition by IL-13. *Eur J Biochem* **260**: 268-274
- Dogne JM, Hanson J, Pratico D (2005) Thromboxane, prostacyclin and isoprostanes: therapeutic targets in atherogenesis. *Trends in pharmacological sciences* **26**: 639-644
- Dolganov G, Bort S, Lovett M, Burr J, Schubert L, Short D, McGurn M, Gibson C, Lewis DB (1996) Coexpression of the interleukin-13 and interleukin-4 genes correlates with their physical linkage in the cytokine gene cluster on human chromosome 5q23-31. *Blood* **87**: 3316-3326
- Dorn GW, 2nd, Force T (2005) Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy. *The Journal of clinical investigation* **115**: 527-537
- Dries DL (2010) Natriuretic peptides and the genomics of left-ventricular hypertrophy. *Heart Fail Clin* **6**: 55-64
- Duque J, Fresno M, Iniguez MA (2005) Expression and function of the nuclear factor of activated T cells in colon carcinoma cells: involvement in the regulation of cyclooxygenase-2. *The Journal of biological chemistry* **280**: 8686-8693
- Durand DB, Shaw JP, Bush MR, Replogle RE, Belagaje R, Crabtree GR (1988) Characterization of antigen receptor response elements within the interleukin-2 enhancer. *Molecular and cellular biology* **8**: 1715-1724
- Espósito G, Rapacciuolo A, Naga Prasad SV, Rockman HA (2002) Cardiac hypertrophy: role of G protein-coupled receptors. *J Card Fail* **8**: S409-414
- 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
- Evron T, Daigle TL, Caron MG (2012) GRK2: multiple roles beyond G protein-coupled receptor desensitization. *Trends in pharmacological sciences* **33**: 154-164
- Fan C, Katsuyama M, Wei H, Xia Q, Liu W, Yabe-Nishimura C (2010) Molecular mechanisms underlying PGF2alpha-induced hypertrophy of vascular smooth muscle cells. *Yakugaku Zasshi* **130**: 211-214
- Fan G, Jiang YP, Lu Z, Martin DW, Kelly DJ, Zuckerman JM, Ballou LM, Cohen IS, Lin RZ (2005) A transgenic mouse model of heart failure using inducible Galpha q. *The Journal of biological chemistry* **280**: 40337-40346

- Feldmann M, Londei M, Haworth C (1989) T cells and lymphokines. *Br Med Bull* **45**: 361-370
- Feldon SE, O'Loughlin CW, Ray DM, Landskroner-Eiger S, Seweryniak KE, Phipps RP (2006) Activated human T lymphocytes express cyclooxygenase-2 and produce proadipogenic prostaglandins that drive human orbital fibroblast differentiation to adipocytes. *Am J Pathol* **169**: 1183-1193
- Ferdinandy P, Schulz R, Baxter GF (2007) Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning, and postconditioning. *Pharmacol Rev* **59**: 418-458
- Feske S, Okamura H, Hogan PG, Rao A (2003) Ca²⁺/calcineurin signalling in cells of the immune system. *Biochemical and biophysical research communications* **311**: 1117-1132
- Filtz TM, Grubb DR, McLeod-Dryden TJ, Luo J, Woodcock EA (2009) Gq-initiated cardiomyocyte hypertrophy is mediated by phospholipase C β 1b. *FASEB J* **23**: 3564-3570
- FitzGerald GA, Austin S, Egan K, Cheng Y, Pratico D (2000) Cyclo-oxygenase products and atherothrombosis. *Ann Med* **32 Suppl 1**: 21-26
- FitzGerald GA, Cheng Y, Austin S (2001) COX-2 inhibitors and the cardiovascular system. *Clin Exp Rheumatol* **19**: S31-36
- Flavahan NA (2007) Balancing prostanoid activity in the human vascular system. *Trends in pharmacological sciences* **28**: 106-110
- Fosslien E (2005) Cardiovascular complications of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Ann Clin Lab Sci* **35**: 347-385
- Fracchia KM, Pai CY, Walsh CM (2013) Modulation of T Cell Metabolism and Function through Calcium Signaling. *Front Immunol* **4**: 324
- Frey N, Olson EN (2003) Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annu Rev Physiol* **65**: 45-79
- Frias MA, Rebsamen MC, Gerber-Wicht C, Lang U (2007) Prostaglandin E₂ activates Stat3 in neonatal rat ventricular cardiomyocytes: A role in cardiac hypertrophy. *Cardiovascular research* **73**: 57-65
- Fujino H, Regan JW (2001) FP prostanoid receptor activation of a T-cell factor/ β -catenin signaling pathway. *The Journal of biological chemistry* **276**: 12489-12492
- Funk CD (2001) Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* **294**: 1871-1875
- Garcia-Hoz C, Sanchez-Fernandez G, Diaz-Meco MT, Moscat J, Mayor F, Ribas C (2010) G α (q) acts as an adaptor protein in protein kinase C zeta (PKCzeta)-mediated ERK5 activation by G protein-coupled receptors (GPCR). *The Journal of biological chemistry* **285**: 13480-13489
- Ghosh S, May MJ, Kopp EB (1998) NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* **16**: 225-260
- Giannico G, Mendez M, LaPointe MC (2005) Regulation of the membrane-localized prostaglandin E synthases mPGES-1 and mPGES-2 in cardiac myocytes and fibroblasts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **288**: H165-174
- Gilbert T, Leclerc C, Moreau M (2011) Control of kidney development by calcium ions. *Biochimie* **93**: 2126-2131
- Glennon PE, Kaddoura S, Sale EM, Sale GJ, Fuller SJ, Sugden PH (1996) Depletion of mitogen-activated protein kinase using an antisense oligodeoxynucleotide approach downregulates the phenylephrine-induced hypertrophic response in rat cardiac myocytes. *Circulation research* **78**: 954-961

- Golebiewska U, Scarlata S (2008) Galphaq binds two effectors separately in cells: evidence for predetermined signaling pathways. *Biophys J* **95**: 2575-2582
- Gorentla BK, Wan CK, Zhong XP (2011) Negative regulation of mTOR activation by diacylglycerol kinases. *Blood* **117**: 4022-4031
- Grandel U, Fink L, Blum A, Heep M, Buerke M, Kraemer HJ, Mayer K, Bohle RM, Seeger W, Grimminger F, Sibelius U (2000) Endotoxin-induced myocardial tumor necrosis factor- α synthesis depresses contractility of isolated rat hearts: evidence for a role of sphingosine and cyclooxygenase-2-derived thromboxane production. *Circulation* **102**: 2758-2764
- Gross G, Imamura T, Vogt SK, Wozniak DF, Nelson DM, Sadovsky Y, Muglia LJ (2000) Inhibition of cyclooxygenase-2 prevents inflammation-mediated preterm labor in the mouse. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **278**: R1415-1423
- Gross GA, Imamura T, Luedke C, Vogt SK, Olson LM, Nelson DM, Sadovsky Y, Muglia LJ (1998) Opposing actions of prostaglandins and oxytocin determine the onset of murine labor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 11875-11879
- Gudermann T, Schoneberg T, Schultz G (1997) Functional and structural complexity of signal transduction via G-protein-coupled receptors. *Annu Rev Neurosci* **20**: 399-427
- Guy CS, Vignali DA (2009) Organization of proximal signal initiation at the TCR:CD3 complex. *Immunol Rev* **232**: 7-21
- Hakeda Y, Shiokawa M, Mano H, Kameda T, Raisz LG, Kumegawa M (1997) Prostaglandin F $_{2\alpha}$ stimulates tyrosine phosphorylation and mitogen-activated protein kinase in osteoblastic MC3T3-E1 cells via protein kinase C activation. *Endocrinology* **138**: 1821-1828
- Haq S, Choukroun G, Kang ZB, Ranu H, Matsui T, Rosenzweig A, Molkenin JD, Alessandrini A, Woodgett J, Hajjar R, Michael A, Force T (2000) Glycogen synthase kinase-3 β is a negative regulator of cardiomyocyte hypertrophy. *The Journal of cell biology* **151**: 117-130
- Hara A, Yuhki K, Fujino T, Yamada T, Takayama K, Kuriyama S, Takahata O, Karibe H, Okada Y, Xiao CY, Ma H, Narumiya S, Ushikubi F (2005) Augmented cardiac hypertrophy in response to pressure overload in mice lacking the prostaglandin I $_2$ receptor. *Circulation* **112**: 84-92
- Hara S, Arai M, Tomaru K, Doi H, Koitabashi N, Iso T, Watanabe A, Tanaka T, Maeno T, Suga T, Yokoyama T, Kurabayashi M (2008) Prostaglandin F $_{2\alpha}$ inhibits SERCA2 gene transcription through an induction of Egr-1 in cultured neonatal rat cardiac myocytes. *International heart journal* **49**: 329-342
- Hara S, Kamei D, Sasaki Y, Tanemoto A, Nakatani Y, Murakami M (2010) Prostaglandin E synthases: Understanding their pathophysiological roles through mouse genetic models. *Biochimie* **92**: 651-659
- Harrington WF, Rodgers ME (1984) Myosin. *Annu Rev Biochem* **53**: 35-73
- 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
- Harris PJ, Thomas D, Morgan TO (1987) Atrial natriuretic peptide inhibits angiotensin-stimulated proximal tubular sodium and water reabsorption. *Nature* **326**: 697-698
- He Q, Harding P, LaPointe MC (2010) PKA, Rap1, ERK1/2, and p90RSK mediate PGE $_2$ and EP $_4$ signaling in neonatal ventricular myocytes. *American journal of physiology* **298**: H136-143
- Hebert RL, Carmosino M, Saito O, Yang G, Jackson CA, Qi Z, Breyer RM, Natarajan C, Hata AN, Zhang Y, Guan Y, Breyer MD (2005) Characterization of a rabbit kidney prostaglandin F $_{2\alpha}$ receptor exhibiting G(i)-restricted signaling that inhibits water absorption in the collecting duct. *The Journal of biological chemistry* **280**: 35028-35037

- Heineke J, Molkenin JD (2006) Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**: 589-600
- Helliwell RJ, Adams LF, Mitchell MD (2004) Prostaglandin synthases: recent developments and a novel hypothesis. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* **70**: 101-113
- Hernandez GL, Volpert OV, Iniguez MA, Lorenzo E, Martinez-Martinez 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
- Hilfiker-Kleiner D, Hilfiker A, Castellazzi M, Wollert KC, Trautwein C, Schunkert H, Drexler H (2006) JunD attenuates phenylephrine-mediated cardiomyocyte hypertrophy by negatively regulating AP-1 transcriptional activity. *Cardiovascular research* **71**: 108-117
- Hilfiker-Kleiner D, Hilfiker A, Kaminski K, Schaefer A, Park JK, Michel K, Quint A, Yaniv M, Weitzman JB, Drexler H (2005) Lack of JunD promotes pressure overload-induced apoptosis, hypertrophic growth, and angiogenesis in the heart. *Circulation* **112**: 1470-1477
- Hill JA, Rothermel B, Yoo KD, Cabuay B, Demetroulis E, Weiss RM, Kutschke W, Bassel-Duby R, Williams RS (2002) Targeted inhibition of calcineurin in pressure-overload cardiac hypertrophy. Preservation of systolic function. *The Journal of biological chemistry* **277**: 10251-10255
- Hirata T, Narumiya S (2012) Prostanoids as regulators of innate and adaptive immunity. *Adv Immunol* **116**: 143-174
- Hishikari K, Suzuki J, Ogawa M, Isobe K, Takahashi T, Onishi M, Takayama K, Isobe M (2009) Pharmacological activation of the prostaglandin E2 receptor EP4 improves cardiac function after myocardial ischaemia/reperfusion injury. *Cardiovascular research* **81**: 123-132
- 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
- Hogan PG, Chen L, Nardone J, Rao A (2003) Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes & development* **17**: 2205-2232
- Horsley V, Pavlath GK (2003) Prostaglandin F2(alpha) stimulates growth of skeletal muscle cells via an NFATC2-dependent pathway. *The Journal of cell biology* **161**: 111-118
- Hou X, Arvisais EW, Jiang C, Chen DB, Roy SK, Pate JL, Hansen TR, Rueda BR, Davis JS (2008) Prostaglandin F2alpha stimulates the expression and secretion of transforming growth factor B1 via induction of the early growth response 1 gene (EGR1) in the bovine corpus luteum. *Mol Endocrinol* **22**: 403-414
- Houweling AC, van Borren MM, Moorman AF, Christoffels VM (2005) Expression and regulation of the atrial natriuretic factor encoding gene Nppa during development and disease. *Cardiovascular research* **67**: 583-593
- Hunter JJ, Chien KR (1999) Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. *N Engl J Med* **341**: 1276-1283
- Ichida M, Finkel T (2001) Ras regulates NFAT3 activity in cardiac myocytes. *The Journal of biological chemistry* **276**: 3524-3530
- Iniguez MA, Cacheiro-Llaguno C, Cuesta N, Diaz-Munoz MD, Fresno M (2008) Prostanoid function and cardiovascular disease. *Arch Physiol Biochem* **114**: 201-209
- Iniguez MA, Martinez-Martinez 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. *The Journal of biological chemistry* **275**: 23627-23635

- Iniguez MA, Punzon C, Fresno M (1999) Induction of cyclooxygenase-2 on activated T lymphocytes: regulation of T cell activation by cyclooxygenase-2 inhibitors. *J Immunol* **163**: 111-119
- Inserte J, Molla B, Aguilar R, Traves PG, Barba I, Martin-Sanz P, Bosca L, Casado M, Garcia-Dorado D (2009) Constitutive COX-2 activity in cardiomyocytes confers permanent cardioprotection. Constitutive COX-2 expression and cardioprotection. *Journal of molecular and cellular cardiology* **46**: 160-168
- Jansen KM, Pavlath GK (2008) Prostaglandin F₂alpha promotes muscle cell survival and growth through upregulation of the inhibitor of apoptosis protein BRUCE. *Cell Death Differ* **15**: 1619-1628
- Jiang QS, Huang XN, Yang GZ, Dai ZK, Zhou QX, Shi JS, Wu Q (2005) Cardiac hypertrophy induced by prostaglandin F₂(alpha) may be mediated by calcineurin signal transduction pathway in rats. *Sheng Li Xue Bao* **57**: 742-748
- Jochum W, Passegue E, Wagner EF (2001) AP-1 in mouse development and tumorigenesis. *Oncogene* **20**: 2401-2412
- Johansson BB, Minsaas L, Aragay AM (2005) Proteasome involvement in the degradation of the G(q) family of Galpha subunits. *FEBS J* **272**: 5365-5377
- Kabashima K, Murata T, Tanaka H, Matsuoka T, Sakata D, Yoshida N, Katagiri K, Kinashi T, Tanaka T, Miyasaka M, Nagai H, Ushikubi F, Narumiya S (2003) Thromboxane A₂ modulates interaction of dendritic cells and T cells and regulates acquired immunity. *Nat Immunol* **4**: 694-701
- Kamon M, Fujita D, Goto N, Amano H, Sakamoto K (2008) Prostaglandin F₂(alpha) negatively regulates bone resorption in murine osteoclast development. *Prostaglandins & other lipid mediators* **87**: 26-33
- Kanaoka Y, Urade Y (2003) Hematopoietic prostaglandin D synthase. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* **69**: 163-167
- Karin M (1995) The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *The Journal of biological chemistry* **270**: 16483-16486
- Kariya K, Farrance IK, Simpson PC (1993) Transcriptional enhancer factor-1 in cardiac myocytes interacts with an alpha 1-adrenergic- and beta-protein kinase C-inducible element in the rat beta-myosin heavy chain promoter. *The Journal of biological chemistry* **268**: 26658-26662
- Karmazyn M (1989) Synthesis and relevance of cardiac eicosanoids with particular emphasis on ischemia and reperfusion. *Can J Physiol Pharmacol* **67**: 912-921
- Karns LR, Kariya K, Simpson PC (1995) M-CAT, CArG, and Sp1 elements are required for alpha 1-adrenergic induction of the skeletal alpha-actin promoter during cardiac myocyte hypertrophy. Transcriptional enhancer factor-1 and protein kinase C as conserved transducers of the fetal program in cardiac growth. *The Journal of biological chemistry* **270**: 410-417
- Kearney PM, Baigent C, Godwin J, Halls H, Emberson JR, Patrono C (2006) Do selective cyclooxygenase-2 inhibitors and traditional non-steroidal anti-inflammatory drugs increase the risk of atherothrombosis? Meta-analysis of randomised trials. *BMJ* **332**: 1302-1308
- Kehat I, Molkentin JD (2010) Molecular pathways underlying cardiac remodeling during pathophysiological stimulation. *Circulation* **122**: 2727-2735
- Keightley MC, Sales KJ, Jabbour HN (2010) PGF₂alpha-F-prostanoid receptor signalling via ADAMTS1 modulates epithelial cell invasion and endothelial cell function in endometrial cancer. *BMC Cancer* **10**: 488
- Klein S, Reuveni H, Levitzki A (2000) Signal transduction by a nondissociable heterotrimeric yeast G protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 3219-3223

- Knowlton KU, Baracchini E, Ross RS, Harris AN, Henderson SA, Evans SM, Glembotski CC, Chien KR (1991) Co-regulation of the atrial natriuretic factor and cardiac myosin light chain-2 genes during alpha-adrenergic stimulation of neonatal rat ventricular cells. Identification of cis sequences within an embryonic and a constitutive contractile protein gene which mediate inducible expression. *The Journal of biological chemistry* **266**: 7759-7768
- Kobayashi T, Narumiya S (2002) Function of prostanoid receptors: studies on knockout mice. *Prostaglandins & other lipid mediators* **68-69**: 557-573
- Kobayashi T, Tahara Y, Matsumoto M, Iguchi M, Sano H, Murayama T, Arai H, Oida H, Yurugi-Kobayashi T, Yamashita JK, Katagiri H, Majima M, Yokode M, Kita T, Narumiya S (2004) Roles of thromboxane A(2) and prostacyclin in the development of atherosclerosis in apoE-deficient mice. *The Journal of clinical investigation* **114**: 784-794
- Komoto J, Yamada T, Watanabe K, Woodward DF, Takusagawa F (2006) Prostaglandin F2alpha formation from prostaglandin H2 by prostaglandin F synthase (PGFS): crystal structure of PGFS containing bimatoprost. *Biochemistry* **45**: 1987-1996
- Kong G, Penn R, Benovic JL (1994) A beta-adrenergic receptor kinase dominant negative mutant attenuates desensitization of the beta 2-adrenergic receptor. *The Journal of biological chemistry* **269**: 13084-13087
- Kovacic-Milivojevic B, Wong VS, Gardner DG (1996) Selective regulation of the atrial natriuretic peptide gene by individual components of the activator protein-1 complex. *Endocrinology* **137**: 1108-1117
- Kujubu DA, Herschman HR (1992) Dexamethasone inhibits mitogen induction of the TIS10 prostaglandin synthase/cyclooxygenase gene. *The Journal of biological chemistry* **267**: 7991-7994
- Kumar A, Humphreys TD, Kremer KN, Bramati PS, Bradfield L, Edgar CE, Hedin KE (2006) CXCR4 physically associates with the T cell receptor to signal in T cells. *Immunity* **25**: 213-224
- Kunapuli P, Lawson JA, Rokach JA, Meinkoth JL, FitzGerald GA (1998) Prostaglandin F2alpha (PGF2alpha) and the isoprostane, 8, 12-iso-isoprostane F2alpha-III, induce cardiomyocyte hypertrophy. Differential activation of downstream signaling pathways. *The Journal of biological chemistry* **273**: 22442-22452
- Kuwahara K, Nakao K (2010) Regulation and significance of atrial and brain natriuretic peptides as cardiac hormones. *Endocr J* **57**: 555-565
- Kuwahara K, Nishikimi T, Nakao K (2012) Transcriptional regulation of the fetal cardiac gene program. *J Pharmacol Sci* **119**: 198-203
- Kuwahara K, Saito Y, Takano M, Arai Y, Yasuno S, Nakagawa Y, Takahashi N, Adachi Y, Takemura G, Horie M, Miyamoto Y, Morisaki T, Kuratomi S, Noma A, Fujiwara H, Yoshimasa Y, Kinoshita H, Kawakami R, Kishimoto I, Nakanishi M, Usami S, Harada M, Nakao K (2003) NRSF regulates the fetal cardiac gene program and maintains normal cardiac structure and function. *EMBO J* **22**: 6310-6321
- Kuwahara K, Wang Y, McAnally J, Richardson JA, Bassel-Duby R, Hill JA, Olson EN (2006) TRPC6 fulfills a calcineurin signaling circuit during pathologic cardiac remodeling. *The Journal of clinical investigation* **116**: 3114-3126
- Lai J, Jin H, Yang R, Winer J, Li W, Yen R, King KL, Zeigler F, Ko A, Cheng J, Bunting S, Paoni NF (1996) Prostaglandin F2 alpha induces cardiac myocyte hypertrophy in vitro and cardiac growth in vivo. *The American journal of physiology* **271**: H2197-2208
- Lee AJ, McCluskey P (2010) Clinical utility and differential effects of prostaglandin analogs in the management of raised intraocular pressure and ocular hypertension. *Clin Ophthalmol* **4**: 741-764

- Lee MJ, Kim MY, Heo SC, Kwon YW, Kim YM, Do EK, Park JH, Lee JS, Han J, Kim JH (2012) Macrophages regulate smooth muscle differentiation of mesenchymal stem cells via a prostaglandin F(2)alpha-mediated paracrine mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **32**: 2733-2740
- Leinwand LA (2001) Calcineurin inhibition and cardiac hypertrophy: a matter of balance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 2947-2949
- Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA (1996) CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* **14**: 233-258
- Li AC, Binder CJ, Gutierrez A, Brown KK, Plotkin CR, Pattison JW, Valledor AF, Davis RA, Willson TM, Witztum JL, Palinski W, Glass CK (2004) Differential inhibition of macrophage foam-cell formation and atherosclerosis in mice by PPARalpha, beta/delta, and gamma. *The Journal of clinical investigation* **114**: 1564-1576
- Li H, Bradbury JA, Dackor RT, Edin ML, Graves JP, DeGraff LM, Wang PM, Bortner CD, Maruoka S, Lih FB, Cook DN, Tomer KB, Jetten AM, Zeldin DC (2011a) Cyclooxygenase-2 regulates Th17 cell differentiation during allergic lung inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* **184**: 37-49
- Li H, Edin ML, Gruzdev A, Cheng J, Bradbury JA, Graves JP, DeGraff LM, Zeldin DC (2013) Regulation of T helper cell subsets by cyclooxygenases and their metabolites. *Prostaglandins & other lipid mediators* **104-105**: 74-83
- Li H, Rao A, Hogan PG (2011b) Interaction of calcineurin with substrates and targeting proteins. *Trends Cell Biol* **21**: 91-103
- Liang Q, Bueno OF, Wilkins BJ, Kuan CY, Xia Y, Molkenkin JD (2003) c-Jun N-terminal kinases (JNK) antagonize cardiac growth through cross-talk with calcineurin-NFAT signaling. *EMBO J* **22**: 5079-5089
- Liao P, Georgakopoulos D, Kovacs A, Zheng M, Lerner D, Pu H, Saffitz J, Chien K, Xiao RP, Kass DA, Wang Y (2001) The in vivo role of p38 MAP kinases in cardiac remodeling and restrictive cardiomyopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 12283-12288
- Liggett SB (2006) Cardiac 7-transmembrane-spanning domain receptor portfolios: diversify, diversify, diversify. *The Journal of clinical investigation* **116**: 875-877
- Liu L, Clipstone NA (2007) Prostaglandin F2alpha inhibits adipocyte differentiation via a G alpha q-calcium-calcineurin-dependent signaling pathway. *Journal of cellular biochemistry* **100**: 161-173
- Liu L, Clipstone NA (2008) Prostaglandin F2alpha induces the normoxic activation of the hypoxia-inducible factor-1 transcription factor in differentiating 3T3-L1 preadipocytes: Potential role in the regulation of adipogenesis. *Journal of cellular biochemistry* **105**: 89-98
- Liu SF, Newton R, Evans TW, Barnes PJ (1996) Differential regulation of cyclo-oxygenase-1 and cyclo-oxygenase-2 gene expression by lipopolysaccharide treatment in vivo in the rat. *Clin Sci (Lond)* **90**: 301-306
- Liu W, Zi M, Jin J, Prehar S, Oceandy D, Kimura TE, Lei M, Neyses L, Weston AH, Cartwright EJ, Wang X (2009) Cardiac-specific deletion of mkk4 reveals its role in pathological hypertrophic remodeling but not in physiological cardiac growth. *Circulation research* **104**: 905-914
- London B (2006) Natriuretic peptides and cardiac hypertrophy. *J Am Coll Cardiol* **48**: 506-507
- Lone AM, Tasken K (2013) Proinflammatory and immunoregulatory roles of eicosanoids in T cells. *Front Immunol* **4**: 130
- Luo C, Shaw KT, Raghavan A, Aramburu J, Garcia-Cozar F, Perrino BA, Hogan PG, Rao A (1996) Interaction of calcineurin with a domain of the transcription factor NFAT1 that controls nuclear import. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 8907-8912

- Lutz S, Freichel-Blomquist A, Yang Y, Rumenapp U, Jakobs KH, Schmidt M, Wieland T (2005) The guanine nucleotide exchange factor p63RhoGEF, a specific link between Gq/11-coupled receptor signaling and RhoA. *The Journal of biological chemistry* **280**: 11134-11139
- Lutz S, Shankaranarayanan A, Coco C, Ridilla M, Nance MR, Vettel C, Baltus D, Evelyn CR, Neubig RR, Wieland T, Tesmer JJ (2007) Structure of Galphaq-p63RhoGEF-RhoA complex reveals a pathway for the activation of RhoA by GPCRs. *Science* **318**: 1923-1927
- Macian F (2005) NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat Rev Immunol* **5**: 472-484
- MacLellan WR, Lee TC, Schwartz RJ, Schneider MD (1994) Transforming growth factor-beta response elements of the skeletal alpha-actin gene. Combinatorial action of serum response factor, YY1, and the SV40 enhancer-binding protein, TEF-1. *The Journal of biological chemistry* **269**: 16754-16760
- Madore E, Harvey N, Parent J, Chapdelaine P, Arosh JA, Fortier MA (2003) An aldose reductase with 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase activity is most likely the enzyme responsible for the production of prostaglandin f2 alpha in the bovine endometrium. *The Journal of biological chemistry* **278**: 11205-11212
- Manicassamy S, Gupta S, Sun Z (2006) Selective function of PKC-theta in T cells. *Cell Mol Immunol* **3**: 263-270
- Marin-Grez M, Fleming JT, Steinhausen M (1986) Atrial natriuretic peptide causes pre-glomerular vasodilatation and post-glomerular vasoconstriction in rat kidney. *Nature* **324**: 473-476
- Martinez-Gonzalez J, Badimon L (2007) Mechanisms underlying the cardiovascular effects of COX-inhibition: benefits and risks. *Curr Pharm Des* **13**: 2215-2227
- Mascareno E, Beckles D, Dhar-Mascareno M, Siddiqui MA (2009) Enhanced hypertrophy in ob/ob mice due to an impairment in expression of atrial natriuretic peptide. *Vascul Pharmacol* **51**: 198-204
- Matsuoka T, Narumiya S (2007) Prostaglandin receptor signaling in disease. *ScientificWorldJournal* **7**: 1329-1347
- McAdam BF, Catella-Lawson F, Mardini IA, Kapoor S, Lawson JA, FitzGerald GA (1999) Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: the human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 272-277
- McGettigan P, Henry D (2006) Cardiovascular risk and inhibition of cyclooxygenase: a systematic review of the observational studies of selective and nonselective inhibitors of cyclooxygenase 2. *JAMA* **296**: 1633-1644
- McKay MK, Huxley VH (1995) ANP increases capillary permeability to protein independent of perfusate protein composition. *The American journal of physiology* **268**: H1139-1148
- McKinsey TA, Olson EN (1999) Cardiac hypertrophy: sorting out the circuitry. *Curr Opin Genet Dev* **9**: 267-274
- Melien O, Thoresen GH, Sandnes D, Ostby E, Christoffersen T (1998) Activation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase by angiotensin II, vasopressin, norepinephrine, and prostaglandin F2alpha in hepatocytes is sustained, and like the effect of epidermal growth factor, mediated through pertussis toxin-sensitive mechanisms. *J Cell Physiol* **175**: 348-358
- Mendez M, LaPointe MC (2002) Trophic effects of the cyclooxygenase-2 product prostaglandin E(2) in cardiac myocytes. *Hypertension* **39**: 382-388
- Mendez M, LaPointe MC (2005) PGE2-induced hypertrophy of cardiac myocytes involves EP4

- receptor-dependent activation of p42/44 MAPK and EGFR transactivation. *American journal of physiology* **288**: H2111-2117
- Mendez-Barbero N, Esteban V, Villahoz S, Escolano A, Urso K, Alfranca A, Rodriguez C, Sanchez SA, Osawa T, Andres V, Martinez-Gonzalez J, Minami T, Redondo JM, Campanero MR (2013) A major role for RCAN1 in atherosclerosis progression. *EMBO Mol Med* **5**: 1901-1917
- Merhi-Soussi F, Dominguez Z, Macovschi O, Dubois M, Savany A, Lagarde M, Prigent AF (2000) Human lymphocytes stimulate prostacyclin synthesis in human umbilical vein endothelial cells. Involvement of endothelial cPLA2. *J Leukoc Biol* **68**: 881-889
- Milne SA, Jabbour HN (2003) Prostaglandin (PG) F(2alpha) receptor expression and signaling in human endometrium: role of PGF(2alpha) in epithelial cell proliferation. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **88**: 1825-1832
- 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. *The Journal of biological chemistry* **279**: 50537-50554
- Mishra S, Ling H, Grimm M, Zhang T, Bers DM, Brown JH (2010) Cardiac hypertrophy and heart failure development through Gq and CaM kinase II signaling. *J Cardiovasc Pharmacol* **56**: 598-603
- Molkentin JD (2004) Calcineurin-NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs. *Cardiovascular research* **63**: 467-475
- Molkentin JD, Dorn GW, 2nd (2001) Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy. *Annu Rev Physiol* **63**: 391-426
- Molkentin JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, Grant SR, Olson EN (1998) A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* **93**: 215-228
- Monks CR, Kupfer H, Tamir I, Barlow A, Kupfer A (1997) Selective modulation of protein kinase C-theta during T-cell activation. *Nature* **385**: 83-86
- Morita I, Schindler M, Regier MK, Otto JC, Hori T, DeWitt DL, Smith WL (1995) Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2. *The Journal of biological chemistry* **270**: 10902-10908
- Morkin E (2000) Control of cardiac myosin heavy chain gene expression. *Microsc Res Tech* **50**: 522-531
- Moulton PJ (1996) Inflammatory joint disease: the role of cytokines, cyclooxygenases and reactive oxygen species. *Br J Biomed Sci* **53**: 317-324
- Murakami M, Nakatani Y, Tanioka T, Kudo I (2002) Prostaglandin E synthase. *Prostaglandins & other lipid mediators* **68-69**: 383-399
- Na HK, Surh YJ (2003) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) ligands as bifunctional regulators of cell proliferation. *Biochemical pharmacology* **66**: 1381-1391
- Nagalla KT, Gole M, Claudino MA, Gardner JD, Murray DB (2012) Alteration in myocardial prostaglandin D synthase expression in pressure overload-induced left ventricular remodeling in rats. *Exp Biol Med (Maywood)* **237**: 24-30
- Napolitani G, Acosta-Rodriguez EV, Lanzavecchia A, Sallusto F (2009) Prostaglandin E2 enhances Th17 responses via modulation of IL-17 and IFN-gamma production by memory CD4+ T cells. *Eur J Immunol* **39**: 1301-1312

- Narumiya S (2003) Prostanoids in immunity: roles revealed by mice deficient in their receptors. *Life Sci* **74**: 391-395
- Narumiya S, FitzGerald GA (2001) Genetic and pharmacological analysis of prostanoid receptor function. *The Journal of clinical investigation* **108**: 25-30
- Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F (1999) Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev* **79**: 1193-1226
- Nemoto S, Sheng Z, Lin A (1998) Opposing effects of Jun kinase and p38 mitogen-activated protein kinases on cardiomyocyte hypertrophy. *Molecular and cellular biology* **18**: 3518-3526
- Neuschafer-Rube F, Engemaier E, Koch S, Boer U, Puschel GP (2003) Identification by site-directed mutagenesis of amino acids contributing to ligand-binding specificity or signal transduction properties of the human FP prostanoid receptor. *Biochem J* **371**: 443-449
- Newman WH, Frankis MB, Halushka PV (1983) Increased myocardial release of prostacyclin in dogs with heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol* **5**: 194-201
- Ngai J, Methi T, Andressen KW, Levy FO, Torgersen KM, Vang T, Wettschureck N, Tasken K (2008) The heterotrimeric G-protein alpha-subunit Galphaq regulates TCR-mediated immune responses through an Lck-dependent pathway. *Eur J Immunol* **38**: 3208-3218
- Niino H, Otsuka T, Izuhara K, Yamaoka K, Ohshima K, Tanabe T, Hara S, Nemoto Y, Tanaka Y, Nakashima H, Niho Y (1997) Regulation by interleukin-10 and interleukin-4 of cyclooxygenase-2 expression in human neutrophils. *Blood* **89**: 1621-1628
- Nishikimi T, Kuwahara K, Nakao K (2011) Current biochemistry, molecular biology, and clinical relevance of natriuretic peptides. *J Cardiol* **57**: 131-140
- Offermanns S, Zhao LP, Gohla A, Sarosi I, Simon MI, Wilkie TM (1998) Embryonic cardiomyocyte hypoplasia and craniofacial defects in G alpha q/G alpha 11-mutant mice. *EMBO J* **17**: 4304-4312
- Oga T, Matsuoka T, Yao C, Nonomura K, Kitaoka S, Sakata D, Kita Y, Tanizawa K, Taguchi Y, Chin K, Mishima M, Shimizu T, Narumiya S (2009) Prostaglandin F(2alpha) receptor signaling facilitates bleomycin-induced pulmonary fibrosis independently of transforming growth factor-beta. *Nat Med* **15**: 1426-1430
- Oh M, Dey A, Gerard RD, Hill JA, Rothermel BA (2010) 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
- Oh-hora M, Rao A (2008) Calcium signaling in lymphocytes. *Curr Opin Immunol* **20**: 250-258
- Ohmichi M, Koike K, Kimura A, Masuhara K, Ikegami H, Ikebuchi Y, Kanzaki T, Touhara K, Sakaue M, Kobayashi Y, Akabane M, Miyake A, Murata Y (1997) Role of mitogen-activated protein kinase pathway in prostaglandin F2alpha-induced rat puerperal uterine contraction. *Endocrinology* **138**: 3103-3111
- Oka Y, Saraiva LR, Kwan YY, Korsching SI (2009) The fifth class of Galpha proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 1484-1489
- Okamura H, Garcia-Rodriguez C, Martinson H, Qin J, Virshup DM, Rao A (2004) A conserved docking motif for CK1 binding controls the nuclear localization of NFAT1. *Molecular and cellular biology* **24**: 4184-4195
- Ortega-Perez I, Redondo JM (2000) [The NFAT transcription factor family as immunosuppression target]. *Nefrologia* **20 Suppl 2**: 25-30

- Oudot F, Grynberg A, Sergiel JP (1995) Eicosanoid synthesis in cardiomyocytes: influence of hypoxia, reoxygenation, and polyunsaturated fatty acids. *The American journal of physiology* **268**: H308-315
- Park CG, Kim YD, Kim MY, Koh JW, Jun JY, Yeum CH, So I, Choi S (2011) Effects of prostaglandin F2alpha on small intestinal interstitial cells of Cajal. *World J Gastroenterol* **17**: 1143-1151
- Park J, Oh Y, Chung KC (2009) Two key genes closely implicated with the neuropathological characteristics in Down syndrome: DYRK1A and RCAN1. *BMB Rep* **42**: 6-15
- Pavlovic S, Du B, Sakamoto K, Khan KM, Natarajan C, Breyer RM, Dannenberg AJ, Falcone DJ (2006) Targeting prostaglandin E2 receptors as an alternative strategy to block cyclooxygenase-2-dependent extracellular matrix-induced matrix metalloproteinase-9 expression by macrophages. *The Journal of biological chemistry* **281**: 3321-3328
- Penela P, Murga C, Ribas C, Lafarga V, Mayor F, Jr. (2010) The complex G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) interactome unveils new physiopathological targets. *Br J Pharmacol* **160**: 821-832
- Penela P, Ribas C, Mayor F, Jr. (2003) Mechanisms of regulation of the expression and function of G protein-coupled receptor kinases. *Cellular signalling* **15**: 973-981
- Peng T, Lu X, Feng Q (2005) NADH oxidase signaling induces cyclooxygenase-2 expression during lipopolysaccharide stimulation in cardiomyocytes. *Faseb J* **19**: 293-295
- Pierce KL, Fujino H, Srinivasan D, Regan JW (1999) Activation of FP prostanoid receptor isoforms leads to Rho-mediated changes in cell morphology and in the cell cytoskeleton. *The Journal of biological chemistry* **274**: 35944-35949
- Ponicke K, Giessler C, Grapow M, Heinroth-Hoffmann I, Becker K, Osten B, Brodde OE (2000) FP-receptor mediated trophic effects of prostanoids in rat ventricular cardiomyocytes. *Br J Pharmacol* **129**: 1723-1731
- Porter CM, Havens MA, Clipstone NA (2000) Identification of amino acid residues and protein kinases involved in the regulation of NFATc subcellular localization. *The Journal of biological chemistry* **275**: 3543-3551
- Potter LR, Abbey-Hosch S, Dickey DM (2006) Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. *Endocr Rev* **27**: 47-72
- Premont RT, Gainetdinov RR (2007) Physiological roles of G protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Annu Rev Physiol* **69**: 511-534
- Pu WT, Ma Q, Izumo S (2003) NFAT transcription factors are critical survival factors that inhibit cardiomyocyte apoptosis during phenylephrine stimulation in vitro. *Circulation research* **92**: 725-731
- Purcell NH, Wilkins BJ, York A, Saba-EI-Leil MK, Meloche S, Robbins J, Molkenin JD (2007) Genetic inhibition of cardiac ERK1/2 promotes stress-induced apoptosis and heart failure but has no effect on hypertrophy in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 14074-14079
- Qian JY, Leung A, Harding P, LaPointe MC (2006) PGE2 stimulates human brain natriuretic peptide expression via EP4 and p42/44 MAPK. *American journal of physiology* **290**: H1740-1746
- Ranger AM, Grusby MJ, Hodge MR, Gravallesse EM, de la Brousse FC, Hoey T, Mickanin C, Baldwin HS, Glimcher LH (1998) The transcription factor NF-ATc is essential for cardiac valve formation. *Nature* **392**: 186-190
- Rao A, Luo C, Hogan PG (1997) Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol* **15**: 707-747

- Ray WA, Stein CM, Daugherty JR, Hall K, Arbogast PG, Griffin MR (2002) COX-2 selective non-steroidal anti-inflammatory drugs and risk of serious coronary heart disease. *Lancet* **360**: 1071-1073
- Regan JW (2003) EP2 and EP4 prostanoid receptor signaling. *Life Sci* **74**: 143-153
- Rhee SG (2001) Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu Rev Biochem* **70**: 281-312
- Ribas C, Penela P, Murga C, Salcedo A, Garcia-Hoz C, Jurado-Pueyo M, Aymerich I, Mayor F, Jr. (2007) The G protein-coupled receptor kinase (GRK) interactome: role of GRKs in GPCR regulation and signaling. *Biochimica et biophysica acta* **1768**: 913-922
- Ricciotti E, FitzGerald GA (2011) Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **31**: 986-1000
- Rinne A, Blatter LA (2010) Activation of NFATc1 is directly mediated by IP3 in adult cardiac myocytes. *American journal of physiology* **299**: H1701-1707
- Rinne A, Kapur N, Molkenin JD, Pogwizd SM, Bers DM, Banach K, Blatter LA (2010) Isoform- and tissue-specific regulation of the Ca(2+)-sensitive transcription factor NFAT in cardiac myocytes and heart failure. *American journal of physiology* **298**: H2001-2009
- Ritchie RH, Schiebinger RJ, LaPointe MC, Marsh JD (1998) Angiotensin II-induced hypertrophy of adult rat cardiomyocytes is blocked by nitric oxide. *The American journal of physiology* **275**: H1370-1374
- Rocca B, FitzGerald GA (2002) Cyclooxygenases and prostaglandins: shaping up the immune response. *Int Immunopharmacol* **2**: 603-630
- Rohini A, Agrawal N, Koyani CN, Singh R (2010) Molecular targets and regulators of cardiac hypertrophy. *Pharmacol Res* **61**: 269-280
- Rostom A, Muir K, Dube C, Jolicoeur E, Boucher M, Joyce J, Tugwell P, Wells GW (2007) Gastrointestinal safety of cyclooxygenase-2 inhibitors: a Cochrane Collaboration systematic review. *Clin Gastroenterol Hepatol* **5**: 818-828, 828 e811-815; quiz 768
- Rothermel BA, McKinsey TA, Vega RB, Nicol RL, Mammen P, Yang J, Antos CL, Shelton JM, Bassel-Duby R, Olson EN, Williams RS (2001) 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
- Rothermel BA, Vega RB, Williams RS (2003) The role of modulatory calcineurin-interacting proteins in calcineurin signaling. *Trends Cardiovasc Med* **13**: 15-21
- Ryeom S, Baek KH, Rieth MJ, Lynch RC, Zaslavsky A, Birsner A, Yoon SS, McKeon F (2008) Targeted deletion of the calcineurin inhibitor DSCR1 suppresses tumor growth. *Cancer Cell* **13**: 420-431
- Sabbieti MG, Marchetti L, Gabrielli MG, Menghi M, Materazzi S, Menghi G, Raisz LG, Hurley MM (2005) Prostaglandins differently regulate FGF-2 and FGF receptor expression and induce nuclear translocation in osteoblasts via MAPK kinase. *Cell Tissue Res* **319**: 267-278
- Sadoshima J, Montagne O, Wang Q, Yang G, Warden J, Liu J, Takagi G, Karoor V, Hong C, Johnson GL, Vatner DE, Vatner SF (2002) The MEKK1-JNK pathway plays a protective role in pressure overload but does not mediate cardiac hypertrophy. *The Journal of clinical investigation* **110**: 271-279
- Saito O, Guan Y, Qi Z, Davis LS, Komhoff M, Sugimoto Y, Narumiya S, Breyer RM, Breyer MD (2003) Expression of the prostaglandin F receptor (FP) gene along the mouse genitourinary tract. *Am J Physiol Renal Physiol* **284**: F1164-1170

- Sakata D, Yao C, Narumiya S (2010) Prostaglandin E2, an immunoactivator. *J Pharmacol Sci* **112**: 1-5
- Sales KJ, List T, Boddy SC, Williams AR, Anderson RA, Naor Z, Jabbour HN (2005) A novel angiogenic role for prostaglandin F2alpha-FP receptor interaction in human endometrial adenocarcinomas. *Cancer Res* **65**: 7707-7716
- Sales KJ, Maldonado-Perez D, Grant V, Catalano RD, Wilson MR, Brown P, Williams AR, Anderson RA, Thompson EA, Jabbour HN (2009) Prostaglandin F(2alpha)-F-prostanoid receptor regulates CXCL8 expression in endometrial adenocarcinoma cells via the calcium-calcieneurin-NFAT pathway. *Biochimica et biophysica acta* **1793**: 1917-1928
- Sales KJ, Milne SA, Williams AR, Anderson RA, Jabbour HN (2004) Expression, localization, and signaling of prostaglandin F2 alpha receptor in human endometrial adenocarcinoma: regulation of proliferation by activation of the epidermal growth factor receptor and mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **89**: 986-993
- Sallese M, Mariggio S, D'Urbano E, Iacovelli L, De Blasi A (2000) Selective regulation of Gq signaling by G protein-coupled receptor kinase 2: direct interaction of kinase N terminus with activated galphaq. *Molecular pharmacology* **57**: 826-831
- Samuelsson B, Morgenstern R, Jakobsson PJ (2007) Membrane prostaglandin E synthase-1: a novel therapeutic target. *Pharmacol Rev* **59**: 207-224
- San-Antonio B, Iniguez MA, Fresno M (2002) Protein kinase Czeta phosphorylates nuclear factor of activated T cells and regulates its transactivating activity. *The Journal of biological chemistry* **277**: 27073-27080
- Sarrazin P, Bkaily G, Hache R, Patry C, Dumais R, Rocha FA, de Brum-Fernandes AJ (2001) Characterization of the prostaglandin receptors in human osteoblasts in culture. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* **64**: 203-210
- Sawyer N, Cauchon E, Chateauneuf A, Cruz RP, Nicholson DW, Metters KM, O'Neill GP, Gervais FG (2002) Molecular pharmacology of the human prostaglandin D2 receptor, CRTH2. *Br J Pharmacol* **137**: 1163-1172
- Schaub MC, Hefti MA (2007) The PGE2-Stat3 connection in cardiac hypertrophy. *Cardiovascular research* **73**: 3-5
- Schlotzer-Schrehardt U, Zenkel M, Nusing RM (2002) Expression and localization of FP and EP prostanoid receptor subtypes in human ocular tissues. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**: 1475-1487
- Schulz RA, Yutzey KE (2004) Calcineurin signaling and NFAT activation in cardiovascular and skeletal muscle development. *Dev Biol* **266**: 1-16
- Serrero G, Lepak NM (1997) Prostaglandin F2alpha receptor (FP receptor) agonists are potent adipose differentiation inhibitors for primary culture of adipocyte precursors in defined medium. *Biochemical and biophysical research communications* **233**: 200-202
- Shaulian E, Karin M (2001) AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* **20**: 2390-2400
- Shen RF, Tai HH (1998) Thromboxanes: synthase and receptors. *J Biomed Sci* **5**: 153-172
- Shinmura K, Tang XL, Wang Y, Xuan YT, Liu SQ, Takano H, Bhatnagar A, Bolli R (2000) Cyclooxygenase-2 mediates the cardioprotective effects of the late phase of ischemic preconditioning in conscious rabbits. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 10197-10202
- Skarra DV, Cornwell T, Solodushko V, Brown A, Taylor MS (2011) CyPPA, a positive modulator of small-conductance Ca(2+)-activated K(+) channels, inhibits phasic uterine contractions and delays preterm birth in mice. *Am J Physiol Cell Physiol* **301**: C1027-1035

- Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM (2000) Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem* **69**: 145-182
- Smith WL, Langenbach R (2001) Why there are two cyclooxygenase isozymes. *The Journal of clinical investigation* **107**: 1491-1495
- Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS (2009) T cell activation. *Annu Rev Immunol* **27**: 591-619
- Sreeramkumar V, Fresno M, Cuesta N (2012) Prostaglandin E2 and T cells: friends or foes? *Immunol Cell Biol* **90**: 579-586
- Streicher JM, Kamei K, Ishikawa TO, Herschman H, Wang Y (2010) Compensatory hypertrophy induced by ventricular cardiomyocyte-specific COX-2 expression in mice. *Journal of molecular and cellular cardiology* **49**: 88-94
- Streicher JM, Wang Y (2008) The role of COX-2 in heart pathology. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* **6**: 69-79
- Sugden PH, Clerk A (1998) Cellular mechanisms of cardiac hypertrophy. *J Mol Med (Berl)* **76**: 725-746
- Sugimoto Y, Hasumoto K, Namba T, Irie A, Katsuyama M, Negishi M, Kakizuka A, Narumiya S, Ichikawa A (1994) Cloning and expression of a cDNA for mouse prostaglandin F receptor. *The Journal of biological chemistry* **269**: 1356-1360
- Suzuki-Yamamoto T, Toida K, Sugimoto Y, Ishimura K (2009) Colocalization of prostaglandin F(2alpha) receptor FP and prostaglandin F synthase-I in the spinal cord. *J Lipid Res* **50**: 1996-2003
- Swayze RD, Braun AP (2001) A catalytically inactive mutant of type I cGMP-dependent protein kinase prevents enhancement of large conductance, calcium-sensitive K⁺ channels by sodium nitroprusside and cGMP. *The Journal of biological chemistry* **276**: 19729-19737
- Swynghedauw B (1986) Developmental and functional adaptation of contractile proteins in cardiac and skeletal muscles. *Physiol Rev* **66**: 710-771
- Szamel M, Resch K (1995) T-cell antigen receptor-induced signal-transduction pathways--activation and function of protein kinases C in T lymphocytes. *Eur J Biochem* **228**: 1-15
- Tachibana H, Perrino C, Takaoka H, Davis RJ, Naga Prasad SV, Rockman HA (2006) JNK1 is required to preserve cardiac function in the early response to pressure overload. *Biochemical and biophysical research communications* **343**: 1060-1066
- Taigen T, De Windt LJ, Lim HW, Molkenin JD (2000) Targeted inhibition of calcineurin prevents agonist-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 1196-1201
- Takayama K, Yuhki K, Ono K, Fujino T, Hara A, Yamada T, Kuriyama S, Karibe H, Okada Y, Takahata O, Taniguchi T, Iijima T, Iwasaki H, Narumiya S, Ushikubi F (2005) Thromboxane A2 and prostaglandin F2alpha mediate inflammatory tachycardia. *Nat Med* **11**: 562-566
- Tanabe T, Tohnai N (2002) Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. *Prostaglandins & other lipid mediators* **68-69**: 95-114
- Tanaka K, Hirai H, Takano S, Nakamura M, Nagata K (2004) Effects of prostaglandin D2 on helper T cell functions. *Biochemical and biophysical research communications* **316**: 1009-1014
- Tanaka K, Ogawa K, Sugamura K, Nakamura M, Takano S, Nagata K (2000) Cutting edge: differential production of prostaglandin D2 by human helper T cell subsets. *J Immunol* **164**: 2277-2280

- Tanaka N, Ryoike T, Hongo M, Mao L, Rockman HA, Clark RG, Ross J, Jr. (1998) Effects of growth hormone and IGF-I on cardiac hypertrophy and gene expression in mice. *The American journal of physiology* **275**: H393-399
- Terrell AM, Crisostomo PR, Wairiuko GM, Wang M, Morrell ED, Meldrum DR (2006) Jak/STAT/SOCS signaling circuits and associated cytokine-mediated inflammation and hypertrophy in the heart. *Shock* **26**: 226-234
- Tilley DG (2011) G protein-dependent and G protein-independent signaling pathways and their impact on cardiac function. *Circulation research* **109**: 217-230
- Tokuda H, Kozawa O, Harada A, Uematsu T (1999) p42/p44 mitogen-activated protein kinase activation is involved in prostaglandin F2alpha-induced interleukin-6 synthesis in osteoblasts. *Cellular signalling* **11**: 325-330
- Tokudome S, Sano M, Shinmura K, Matsushashi T, Morizane S, Moriyama H, Tamaki K, Hayashida K, Nakanishi H, Yoshikawa N, Shimizu N, Endo J, Katayama T, Murata M, Yuasa S, Kaneda R, Tomita K, Eguchi N, Urade Y, Asano K, Utsunomiya Y, Suzuki T, Taguchi R, Tanaka H, Fukuda K (2009) Glucocorticoid protects rodent hearts from ischemia/reperfusion injury by activating lipocalin-type prostaglandin D synthase-derived PGD2 biosynthesis. *The Journal of clinical investigation* **119**: 1477-1488
- Trivedi SG, Newson J, Rajakariar R, Jacques TS, Hannon R, Kanaoka Y, Eguchi N, Colville-Nash P, Gilroy DW (2006) Essential role for hematopoietic prostaglandin D2 synthase in the control of delayed type hypersensitivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 5179-5184
- Truneh A, Albert F, Golstein P, Schmitt-Verhulst AM (1985) Early steps of lymphocyte activation bypassed by synergy between calcium ionophores and phorbol ester. *Nature* **313**: 318-320
- Tsoukas CD, Stanners J, Ching KA (2000) Activation of heterotrimeric GTP-binding proteins upon TCR/CD3 engagement. *Methods Mol Biol* **134**: 319-324
- Tuteja N (2009) Signaling through G protein coupled receptors. *Plant Signal Behav* **4**: 942-947
- Ullman KS, Northrop JP, Verweij CL, Crabtree GR (1990) Transmission of signals from the T lymphocyte antigen receptor to the genes responsible for cell proliferation and immune function: the missing link. *Annu Rev Immunol* **8**: 421-452
- Urade Y, Hayaishi O (2000) Biochemical, structural, genetic, physiological, and pathophysiological features of lipocalin-type prostaglandin D synthase. *Biochimica et biophysica acta* **1482**: 259-271
- Urso K, Alfranca A, Martinez-Martinez S, Escolano A, Ortega I, Rodriguez A, Redondo JM (2011) NFATc3 regulates the transcription of genes involved in T-cell activation and angiogenesis. *Blood* **118**: 795-803
- Ushikubi F, Aiba Y, Nakamura K, Namba T, Hirata M, Mazda O, Katsura Y, Narumiya S (1993) Thromboxane A2 receptor is highly expressed in mouse immature thymocytes and mediates DNA fragmentation and apoptosis. *J Exp Med* **178**: 1825-1830
- van Leeuwen JE, Samelson LE (1999) T cell antigen-receptor signal transduction. *Curr Opin Immunol* **11**: 242-248
- van Rooij E, Doevendans PA, Crijns HJ, Heeneman S, Lips DJ, van Bilsen M, Williams RS, Olson EN, Bassel-Duby R, Rothermel BA, De Windt LJ (2004) MCIP1 overexpression suppresses left ventricular remodeling and sustains cardiac function after myocardial infarction. *Circulation research* **94**: e18-26
- van Rooij E, Doevendans PA, de Theije CC, Babiker FA, Molkenin JD, de Windt LJ (2002) Requirement of nuclear factor of activated T-cells in calcineurin-mediated cardiomyocyte hypertrophy. *The Journal of biological chemistry* **277**: 48617-48626

- Vega RB, Bassel-Duby R, Olson EN (2003a) Control of cardiac growth and function by calcineurin signaling. *The Journal of biological chemistry* **278**: 36981-36984
- Vega RB, Rothermel BA, Weinheimer CJ, Kovacs A, Naseem RH, Bassel-Duby R, Williams RS, Olson EN (2003b) 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
- Vila L (2004) Cyclooxygenase and 5-lipoxygenase pathways in the vessel wall: role in atherosclerosis. *Medicinal research reviews* **24**: 399-424
- Wallace AE, Catalano RD, Anderson RA, Jabbour HN (2011) Chemokine (C-C) motif ligand 20 is regulated by PGF(2alpha)-F-prostanoid receptor signalling in endometrial adenocarcinoma and promotes cell proliferation. *Mol Cell Endocrinol* **331**: 129-135
- Wallace AE, Sales KJ, Catalano RD, Anderson RA, Williams AR, Wilson MR, Schwarze J, Wang H, Rossi AG, Jabbour HN (2009) Prostaglandin F2alpha-F-prostanoid receptor signaling promotes neutrophil chemotaxis via chemokine (C-X-C motif) ligand 1 in endometrial adenocarcinoma. *Cancer Res* **69**: 5726-5733
- Walters RD, Drullinger LF, Kugel JF, Goodrich JA (2013) NFATc2 recruits cJun homodimers to an NFAT site to synergistically activate interleukin-2 transcription. *Mol Immunol* **56**: 48-56
- Wang BH, Bertucci MC, Ma JY, Adrahtas A, Cheung RY, Krum H (2010) Celecoxib, but not rofecoxib or naproxen, attenuates cardiac hypertrophy and fibrosis induced in vitro by angiotensin and aldosterone. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **37**: 912-918
- Wang D, Patel VV, Ricciotti E, Zhou R, Levin MD, Gao E, Yu Z, Ferrari VA, Lu MM, Xu J, Zhang H, Hui Y, Cheng Y, Petrenko N, Yu Y, FitzGerald GA (2009) Cardiomyocyte cyclooxygenase-2 influences cardiac rhythm and function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 7548-7552
- Wang J, Paradis P, Aries A, Komati H, Lefebvre C, Wang H, Nemer M (2005) Convergence of protein kinase C and JAK-STAT signaling on transcription factor GATA-4. *Molecular and cellular biology* **25**: 9829-9844
- Wang Y, Huang S, Sah VP, Ross J, Jr., Brown JH, Han J, Chien KR (1998a) Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38 mitogen-activated protein kinase family. *The Journal of biological chemistry* **273**: 2161-2168
- Wang Y, Su B, Sah VP, Brown JH, Han J, Chien KR (1998b) Cardiac hypertrophy induced by mitogen-activated protein kinase kinase 7, a specific activator for c-Jun NH2-terminal kinase in ventricular muscle cells. *The Journal of biological chemistry* **273**: 5423-5426
- Warner TD, Giuliano F, Vojnovic I, Bukasa A, Mitchell JA, Vane JR (1999) Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: a full in vitro analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 7563-7568
- Watanabe T, Nakao A, Emerling D, Hashimoto Y, Tsukamoto K, Horie Y, Kinoshita M, Kurokawa K (1994) Prostaglandin F2 alpha enhances tyrosine phosphorylation and DNA synthesis through phospholipase C-coupled receptor via Ca(2+)-dependent intracellular pathway in NIH-3T3 cells. *The Journal of biological chemistry* **269**: 17619-17625
- Watkins H, Rosenzweig A, Hwang DS, Levi T, McKenna W, Seidman CE, Seidman JG (1992) Characteristics and prognostic implications of myosin missense mutations in familial hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med* **326**: 1108-1114
- Wei LL, Shen YD, Zhang YC, Hu XY, Lu PL, Wang L, Chen W (2010) Roles of the prostaglandin E2 receptors EP subtypes in Alzheimer's disease. *Neurosci Bull* **26**: 77-84

- Werlen G, Jacinto E, Xia Y, Karin M (1998) Calcineurin preferentially synergizes with PKC-theta to activate JNK and IL-2 promoter in T lymphocytes. *EMBO J* **17**: 3101-3111
- Wilkins BJ, Dai YS, Bueno OF, Parsons SA, Xu J, Plank DM, Jones F, Kimball TR, Molkentin JD (2004) Calcineurin/NFAT coupling participates in pathological, but not physiological, cardiac hypertrophy. *Circulation research* **94**: 110-118
- Wilkins BJ, De Windt LJ, Bueno OF, Braz JC, Glascock BJ, Kimball TF, Molkentin JD (2002) Targeted disruption of NFATc3, but not NFATc4, reveals an intrinsic defect in calcineurin-mediated cardiac hypertrophic growth. *Molecular and cellular biology* **22**: 7603-7613
- Wilkins BJ, Molkentin JD (2004) Calcium-calcineurin signaling in the regulation of cardiac hypertrophy. *Biochemical and biophysical research communications* **322**: 1178-1191
- Wong SC, Fukuchi M, Melnyk P, Rodger I, Giaid A (1998) Induction of cyclooxygenase-2 and activation of nuclear factor-kappaB in myocardium of patients with congestive heart failure. *Circulation* **98**: 100-103
- Woodward DF, Jones RL, Narumiya S (2011) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXIII: classification of prostanoid receptors, updating 15 years of progress. *Pharmacol Rev* **63**: 471-538
- Wu R, Laplante MA, de Champlain J (2005) Cyclooxygenase-2 inhibitors attenuate angiotensin II-induced oxidative stress, hypertension, and cardiac hypertrophy in rats. *Hypertension* **45**: 1139-1144
- Xiao CY, Yuhki K, Hara A, Fujino T, Kuriyama S, Yamada T, Takayama K, Takahata O, Karibe H, Taniguchi T, Narumiya S, Ushikubi F (2004) Prostaglandin E2 protects the heart from ischemia-reperfusion injury via its receptor subtype EP4. *Circulation* **109**: 2462-2468
- Xie W, Herschman HR (1996) Transcriptional regulation of prostaglandin synthase 2 gene expression by platelet-derived growth factor and serum. *The Journal of biological chemistry* **271**: 31742-31748
- Xu W, Chou CL, Sun H, Fujino H, Chen QM, Regan JW (2008) FP prostanoid receptor-mediated induction of the expression of early growth response factor-1 by activation of a Ras/Raf/mitogen-activated protein kinase signaling cascade. *Molecular pharmacology* **73**: 111-118
- Yang J, Rothermel B, Vega RB, Frey N, McKinsey TA, Olson EN, Bassel-Duby R, Williams RS (2000a) Independent signals control expression of the calcineurin inhibitory proteins MCIP1 and MCIP2 in striated muscles. *Circulation research* **87**: E61-68
- Yang XY, Wang LH, Chen T, Hodge DR, Resau JH, DaSilva L, Farrar WL (2000b) Activation of human T lymphocytes is inhibited by peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) agonists. PPARgamma co-association with transcription factor NFAT. *The Journal of biological chemistry* **275**: 4541-4544
- Yang YJ, Chen W, Edgar A, Li B, Molkentin JD, Berman JN, Lin TJ (2009) Rcan1 negatively regulates Fc epsilonRI-mediated signaling and mast cell function. *J Exp Med* **206**: 195-207
- Yao C, Sakata D, Esaki Y, Li Y, Matsuoka T, Kuroiwa K, Sugimoto Y, Narumiya S (2009) Prostaglandin E2-EP4 signaling promotes immune inflammation through Th1 cell differentiation and Th17 cell expansion. *Nat Med* **15**: 633-640
- Yokoyama U, Iwatsubo K, Umemura M, Fujita T, Ishikawa Y (2013) The prostanoid EP4 receptor and its signaling pathway. *Pharmacol Rev* **65**: 1010-1052
- Yu Y, Lucitt MB, Stubbe J, Cheng Y, Friis UG, Hansen PB, Jensen BL, Smyth EM, FitzGerald GA (2009) Prostaglandin F2alpha elevates blood pressure and promotes atherosclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 7985-7990

- Yuhki K, Kojima F, Kashiwagi H, Kawabe J, Fujino T, Narumiya S, Ushikubi F (2011) Roles of prostanoids in the pathogenesis of cardiovascular diseases: Novel insights from knockout mouse studies. *Pharmacol Ther* **129**: 195-205
- Zamorano B, Carmona MT (1992) Prostaglandin-E2 and cyclic adenosine 3'-5' monophosphate levels in the hypertrophied rat heart. *Biol Res* **25**: 85-89
- Zarain-Herzberg A, Fragoso-Medina J, Estrada-Aviles R (2011) Calcium-regulated transcriptional pathways in the normal and pathologic heart. *IUBMB Life* **63**: 847-855
- Zechner D, Thuerauf DJ, Hanford DS, McDonough PM, Glembotski CC (1997) A role for the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in myocardial cell growth, sarcomeric organization, and cardiac-specific gene expression. *The Journal of cell biology* **139**: 115-127
- Zhai P, Galeotti J, Liu J, Holle E, Yu X, Wagner T, Sadoshima J (2006) An angiotensin II type 1 receptor mutant lacking epidermal growth factor receptor transactivation does not induce angiotensin II-mediated cardiac hypertrophy. *Circulation research* **99**: 528-536
- Zhang J, Gong Y, Yu Y (2010) PG F(2alpha) Receptor: A Promising Therapeutic Target for Cardiovascular Disease. *Front Pharmacol* **1**: 116
- Zou Y, Hiroi Y, Uozumi H, Takimoto E, Toko H, Zhu W, Kudoh S, Mizukami M, Shimoyama M, Shibasaki F, Nagai R, Yazaki Y, Komuro I (2001) Calcineurin plays a critical role in the development of pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *Circulation* **104**: 97-101

