



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Implicación del *Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1 (LRP1)* en el remodelado vascular y cardiaco

Elena Revuelta López

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

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

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

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA



UNIVERSITAT DE BARCELONA



**IMPLICACIÓN DEL *LOW DENSITY*
LIPOPROTEIN RECEPTOR-RELATED
PROTEIN 1 (LRP1) EN EL REMODELADO
VASCULAR Y CARDIACO**

ELENA REVUELTA LÓPEZ

TESIS DOCTORAL

Barcelona, Septiembre 2015

UNIVERSIDAD DE BARCELONA
FACULTAD DE FARMACIA
PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA

La presente tesis doctoral: “Implicación del *Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1* (LRP1) en el remodelado vascular y cardiaco”, ha sido realizada en el Centro de Investigación Cardiovascular CSIC-ICCC, IIB-Sant Pau del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona por la licenciada en Biología Elena Revuelta López para optar al grado de Doctor por la Universidad de Barcelona bajo la dirección de la Doctora Vicenta Llorente Cortés.

La directora: Dra. Vicenta Llorente Cortés

El doctorando: Elena Revuelta López

Barcelona, Septiembre 2015

El colesterol es a la sangre lo que Gandalf al balrog de Moria

ÍNDICE

ÍNDICE

ÍNDICE.....	7
ABREVIATURAS.....	13
INTRODUCCIÓN.....	19
1. ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR.....	21
1.1 Factores de riesgo cardiovascular.....	21
2. ATEROSCLEROSIS Y TROMBOSIS.....	23
3. LIPOPROTEÍNAS.....	25
3.1 ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN DE LAS LIPOPROTEÍNAS.....	25
3.2 METABOLISMO DE LAS LIPOPROTEÍNAS.....	27
3.2.1 Metabolismo de lípidos exógenos.....	27
3.2.2 Metabolismo de lípidos endógenos.....	28
3.2.3 Transporte reverso de colesterol.....	29
3.3 HIPERLIPEMIA.....	30
3.4 LDL MODIFICADAS.....	31
4. PARED VASCULAR.....	33
5. FISIOPATOLOGÍA DE LA ATEROSCLEROSIS.....	34
5.1 Disfunción endotelial.....	34
5.2 Desarrollo de la lesión aterosclerótica.....	35
5.2.1 Inicio de la lesión.....	35
5.2.2 Progresión de la lesión aterosclerótica.....	37
5.2.3 Vulnerabilidad de la placa.....	39
6. RECEPTORES LIPOPROTEICOS.....	41
6.1 Receptores <i>scavengers</i>	41
6.2 Familia de receptores de las LDL.....	43
6.2.1 LDL-r.....	43
6.3 Receptor de las VLDL (VLDL-r).....	44
6.4 LDL <i>receptor-related protein 1</i> (LRP1).....	45
6.4.1 LRP1 en la aterosclerosis.....	46
7. MIOCARDIO: CONTRACCIÓN Y METABOLISMO.....	48
7.1 CONTRACCIÓN CARDIACA.....	48
7.2 METABOLISMO LIPÍDICO CARDIACO.....	49
8. HIPOXIA Y SUS EFECTOS CARDIOVASCULARES.....	51
8.1 HIPOXIA.....	51
8.2 MODIFICACIÓN DE LIPOPROTEÍNAS.....	52
8.3 HIPOXIA: REMODELADO VASCULAR Y CARDIACO.....	53
9. REMODELADO VASCULAR.....	54
9.1 METALOPROTEINASAS (MMPS).....	54

ÍNDICE

9.2 ATEROSCLEROSIS E HIPOXIA EN LA PARED VASCULAR	55
9.3 IMPLICACIÓN DEL LRP1 EN EL REMODELADO VASCULAR.....	56
10. REMODELADO CARDIACO	58
10.1 IMPACTO DE LA DISLIPIDEMIA EN EL REMODELADO CARDIACO	58
10.1.1 Alteraciones en composición y estructura del miocardio hipercolesterolemico ..	58
10.1.2 Alteraciones en función cardiaca.....	59
10.2 IMPACTO DE LA ISQUEMIA MIOCÁRDICA EN EL REMODELADO CARDIACO	60
10.2.1 Alteraciones en el manejo del calcio y en la función contráctil del miocardio isquémico	60
10.2.2 Alteraciones en composición y estructura en el miocardio isquémico	61
10.2.3 Acumulación lipídica en el miocardio isquémico	61
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	63
MATERIALES Y MÉTODOS.....	67
1. CULTIVOS CELULARES.....	69
1.1 Células musculares lisas vasculares humanas	69
1.2 Células musculares lisas vasculares murinas.....	69
1.3 Cardiomiocitos HL-1	70
1.4 Macrófagos derivados de monocitos humanos (MDMH)	71
1.5 Tratamientos celulares.....	71
2. MODELOS ANIMALES	72
3. TEJIDO MIOCÁRDICO HUMANO	72
4. LIPOPROTEÍNAS	73
4.1 Aislamiento y caracterización de lipoproteínas humanas	73
4.1.1 Aislamiento de lipoproteínas	73
4.1.2 Caracterización de las lipoproteínas.....	74
4.2 Modificación de las LDL por agregación.....	75
4.3 Acumulación lipídica intracelular.....	75
4.3.1 Extracción lipídica	76
4.3.2 Cromatografía en capa fina (CCF).....	76
5. BIOLOGÍA CELULAR	77
5.1 Silenciamiento génico mediante pequeños RNA de interferencia (siRNA) en hVSMCs y cardiomiocitos HL-1	77
5.2 Silenciamiento farmacológico.....	78
5.3 Ensayos de transfección transitoria.....	78
5.4 Migración celular.....	78
5.5 Análisis inmunohistoquímicos	79

ÍNDICE

5.6 Inmunofluorescencia indirecta	79
5.7 Estrés oxidativo	80
5.8 Manejo del calcio intracelular	81
6. BIOLOGÍA MOLECULAR	81
6.1 Análisis de la actividad de las metaloproteasas (MMPs).....	81
6.1.1 Preparación de las muestras	81
6.1.2 Zimografía	81
6.2 Análisis de la expresión de mRNA y niveles de proteína	82
6.2.1 PCR.....	82
6.2.2 Western Blot.....	84
6.3 Aislamiento de extractos nucleares y citosólicos a partir de hVSMCs.....	87
6.4 Inmunoprecipitación de LRP1 total.	87
7. TECNICAS FÍSICAS.....	87
7.1 Espectroscopía Infrarroja por Transformadas de Fourier (FITR).....	87
7.2 Análisis termogravimétrico.....	88
7.3 Escaneo calorimétrico diferencial (DSC).....	88
INFORME DEL FACTOR DE IMPACTO DE LOS ARTÍCULOS PUBLICADOS Y DE LA PARTICIPACIÓN DEL DOCTORANDO.....	89
RESULTADOS	97
DISCUSIÓN	165
APÉNDICE.....	185
AGRADECIMIENTOS.....	189
BIBLIOGRAFÍA	195

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ABCA-1	<i>ATP-binding cassette-1</i>
ACAT	Acetil colesterol acil transferasa
AG	Ácidos grasos
AngII	Angiotensina II
Apo	Apolipoproteína
ARH	<i>Autosomal recessive hypercholesterolemia protein</i>
BCA	Ácido bicinconínico
BrEt	Bromuro de Etidio
BSA	Albúmina bovina
CAM	Molécula de adhesión celular
Cat	Catepsina
CCF	Cromatografía en capa fina
CE	Colesterol esterificado
CETP	Proteína transportadora de ésteres de colesterol
CS-PG	Coindroitin sulfato proteoglicano
cDNA	DNA complementario
DAB	3,3'-diaminobenzidine
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride
DiI	1,1'-dioctadecyl-3,3,3,3'-tetramethylin-docarbocyanine
DHE	Dihidroetidio
DNA	Ácido dexosirribonucleico
ECV	Enfermedad cardiovascular
EDTA	Ácido dietilaminotetracético
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EPO	Eritropoyetina
FC	Colesterol libre
FRVC	Factor de riesgo cardiovascular
GAG	Glicoaminoglicanos
h	Horas
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazinetansulfónico
HIF	Factor de transcripción inducible por la hipoxia
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metil-glutaril reductasa
HRE	<i>Hypoxia responsive elements</i>
HS-PG	Heparán sulfato proteoglicano
HTA	Hipertensión arterial

ABREVIATURAS

hVSMC	<i>Human vascular smooth muscle cells</i>
IDL	Lipoproteína de densidad intermedia
IFN- γ	Interferón γ
IL	Interleuquina
L	Litro
LCAT	Lecitin colesterol acil transferasa
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LDL _{ag}	LDL modificada por agregación
LDL _n	LDL nativa
LDL _{ox}	LDL oxidada
LDLR	Receptor de las LDL
LPL	Lipoproteinlipasa
LRP-1	<i>Low density lipoprotein receptor-related protein 1</i>
MCP-1	Proteína quimiotáctica de monocitos-1
M-CSF	Factor estimulante de colonias de monocitos
MDA	Ácido malondialdehído
MEC	Matriz extracelular
MDMH	Macrófagos derivados de monocitos humanos
MMPs	Metaloproteasas
mg	Miligramo
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensajero
nm	Nanómetro
mVSMC	<i>Mouse vascular smooth muscle cells</i>
NCX	Bomba de intercambio Na ⁺ -Ca ²⁺
NO	Óxido nítrico
PBS	Tampón <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCSK-9	<i>Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9</i>
PG	Proteoglicano
PI3-K	Fosfatidilinositol 3-quinasa
PKA	Protein Quinasa A
PKC	Protein Quinasa C
PLA ₂	Fosfolipasa 2
PLN	<i>Phospholamban</i>
Pyk2	<i>Proline-rich tyrosine kinase 2</i>

ABREVIATURAS

QM	Quilomicrón
LDL-r	Receptor de las LDL
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RS	Retículo sarcoplásmico
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real
RyR	Receptor de rianodina
SBF	Suero Bovino Fetal
seg	Segundos
SERCA	ATPasa del retículo sarcoplásmico que transfiere Ca ²⁺
siRNA	<i>small interference RNA</i> (pequeños RNA de interferencia)
SR	<i>Scavenger receptor</i>
SREBP	<i>Sterol regulatory element binding protein</i>
TA	Temperatura ambiente
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TBE	Tampón Tris, borato, EDTA
TBS	Tampón Tris salino
TBARS	<i>Thiobarbituric Acid Reactive Substances</i>
TE	Tropoelastina
TF	Factor tisular
TIMP	<i>Tissue inhibitor metalloproteinase</i>
TLRs	Receptores <i>Toll-like</i>
TG	Triglicérido
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad
VLDL-r	Receptor de las VLDL
ZDF	<i>Zucker Diabetic Fat</i> (Ratas diabéticas obesas Zucker)

INTRODUCCIÓN

1. ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son un conjunto de trastornos del corazón y los vasos sanguíneos causados principalmente por obstrucciones del flujo sanguíneo. La Organización Mundial de la Salud (OMS) divide las ECV en 7 grandes grupos: la cardiopatía coronaria, la enfermedad cerebrovascular, la arteriopatía periférica, la cardiopatía reumática, la cardiopatía congénita, la trombosis venosa profunda y la embolia pulmonar [1].

Según datos de la OMS, la cardiopatía coronaria y la enfermedad cerebrovascular, que afectan a los vasos que irrigan el músculo cardíaco y el cerebro respectivamente, son la principal causa de muerte en el mundo, fallecen más personas por ECV que por cualquier otra causa. La mayor incidencia de ECV se produce en países de ingresos medios y bajos y afecta por igual a hombres y mujeres [1]. El 30% de las muertes registradas en el mundo en 2008 fueron debidas a ECV y AVC (accidentes vasculares cerebrales) y se prevee que en el año 2030 sigan siendo la principal causa de muerte [2].

Un reciente estudio epidemiológico sobre la enfermedad cardiovascular refleja que aunque nuestro país posea una menor tasa de mortalidad por ECV que otros países europeos, la enfermedad isquémica (CI) es actualmente la principal causa de muerte por enfermedad cardiovascular en España [3]. Según la Sociedad Española de Cardiología (SEC), la ECV produce 65 veces más defunciones que los accidentes de tráfico en España.

1.1 Factores de riesgo cardiovascular

El Dr. William B Kannel, pionero en epidemiología cardiovascular e Investigador Principal en el Estudio Framingham, definió el factor de riesgo cardiovascular (FRVC) como “una característica fisiológica o hábito de vida que aumenta la posibilidad (riesgo) de padecer una enfermedad cardiovascular, mortal o no mortal, en aquellos individuos que la/lo presentan”.

Los FRVC pueden dividirse en principales, como son el consumo de tabaco, la diabetes, la hipertensión arterial (HTA), el colesterol total o c-LDL elevado, el c-HDL bajo y la edad avanzada; en predisponentes, como la obesidad central, el sedentarismo, los antecedentes familiares, factores étnicos y psicosociales; y en condicionantes, como la hipertrigliceridemia,

partículas LDL pequeñas y densas, y factores protrombóticos (fibrinógeno elevado) entre otros [4]. El aumento de la relación colesterol LDL/HDL [5-7] y de los niveles de TG [8] en plasma son unos de los principales FRVC que desembocan en ECV. La diabetes y la resistencia a la insulina todavía incrementan más el riesgo cardiovascular.

La edad, al igual que otros factores como el historial familiar, el sexo y la raza o etnia, juegan un papel muy importante en el desarrollo de ECV pero son FRVC no modificables. Sin embargo, la alimentación no saludable, el sedentarismo y el consumo abusivo de tabaco y alcohol, FRVC causantes de la mayor parte de las ECV y AVC, sí que son modificables. Por lo tanto, aproximadamente un 80% de los eventos cardíacos podrían evitarse con hábitos de vida saludables.

La ausencia de FRVC no implica que no surjan eventos de EVC, a la vez que su presencia tampoco implica que se vaya a producir un evento, aunque sí aumenta su probabilidad. Hoy en día se promueven hábitos saludables y estrategias de detección de FRVC para reducir la probabilidad de padecer o morir por una ECV [9].

2. ATEROSCLEROSIS Y TROMBOSIS

La arteriosclerosis engloba un conjunto de enfermedades caracterizadas por el remodelado vascular y el engrosamiento de las paredes arteriales. La más prevalente, la aterosclerosis, afecta a las arterias de calibre medio y grande. La aterosclerosis es una enfermedad crónica, progresiva y dinámica que se caracteriza por la rigidez de las arterias al formarse la placa aterosclerótica, resultado de la acumulación de lípidos, de elementos fibrosos y de otros productos sanguíneos en la pared vascular [10].

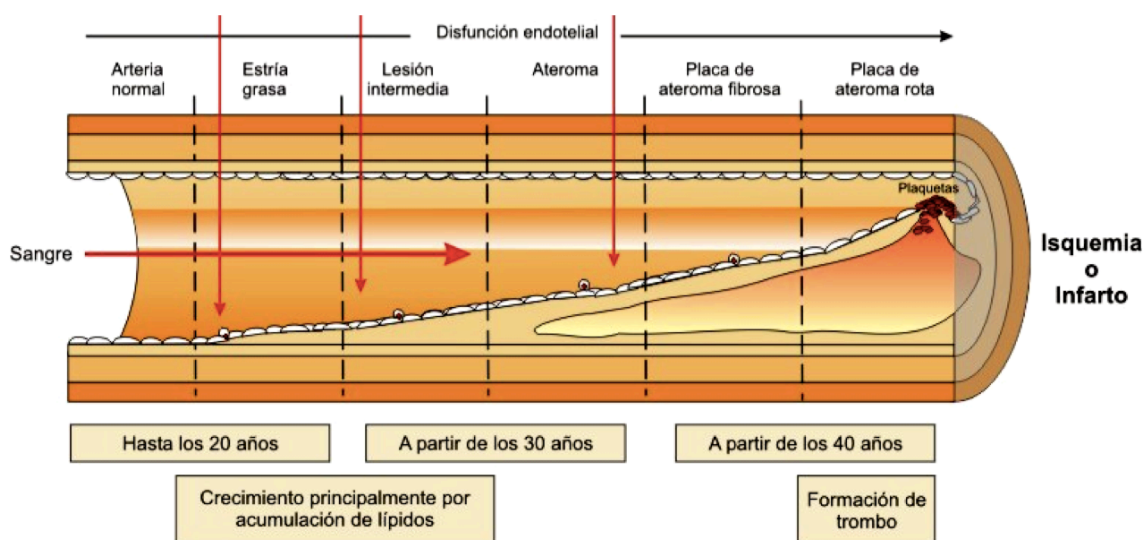


Figura 1. Esquema de la progresión de la aterosclerosis. La aterosclerosis es una enfermedad crónica y progresiva que comienza a temprana edad y evoluciona más o menos rápido dependiendo de los FRCV.

Estímulos sistémicos como la hipercolesterolemia pueden inducir una respuesta inflamatoria crónica en la pared del vaso que desemboca en disfunción endotelial. Como resultado de la alteración de la permeabilidad vascular, se modifica el tráfico de macromoléculas, aumenta la expresión de moléculas de adhesión y la migración de leucocitos a través de la pared vascular. Si no se consigue neutralizar la respuesta inflamatoria, posteriormente se estimula la proliferación y migración de las células musculares lisas del vaso (VSMC, del inglés *vascular smooth muscle cells*) [11], complicándose el problema inflamatorio.

La disfunción endotelial permite la formación de la placa aterosclerótica. El proceso comienza con pequeños depósitos de material lipídico que producen el engrosamiento de la íntima. Según va progresando la lesión, el lumen arterial se reduce con la consecuente

INTRODUCCIÓN

disminución de flujo sanguíneo. El progreso de la lesión es silente y puede evolucionar durante décadas sin dar síntomas clínicos. La vulnerabilidad y ruptura de la placa aterosclerótica, clave en la producción del evento clínico, depende principalmente de su composición y del grosor de la cubierta fibrosa [12]. Cuando se rompe la placa y se expone la capa subendotelial trombogénica al torrente sanguíneo, se forma el trombo [13]. Si el trombo no ocluye el vaso pero reduce el flujo sanguíneo, se produce una angina inestable. Si el trombo tapona el vaso, se produce el infarto agudo de miocardio [14].

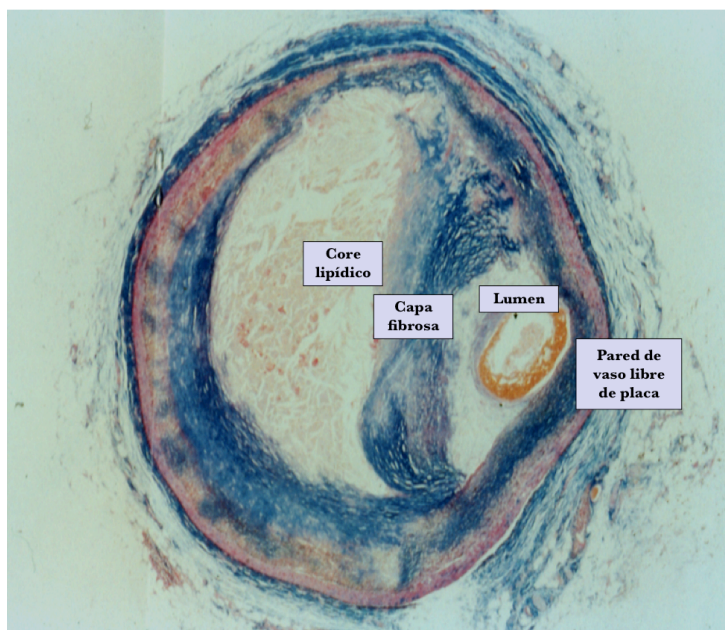


Figura 2. Sección transversal de una arteria. Imagen de la sección transversal de una arteria con lesión aterosclerótica avanzada.

3. LIPOPROTEÍNAS

3.1 ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN DE LAS LIPOPROTEÍNAS

Los lípidos tienen un carácter fuertemente anfipático, con una parte hidrofílica y otra hidrofóbica. Por tanto, requieren la unión de una fracción proteica (apolipoproteínas, apo) para ser transportados en el suero. Los complejos moleculares formados por lípidos-apolipoproteínas se conocen como lipoproteínas.

Las lipoproteínas poseen una estructura de pseudomicela (Figura 3). La capa externa en contacto con el medio acuoso está formada por la fracción proteica apo y lípidos polares, colesterol y fosfolípidos; mientras que el núcleo hidrofóbico interno lo constituyen los lípidos apolares, triglicéridos (TG) y colesterol esterificado (CE).

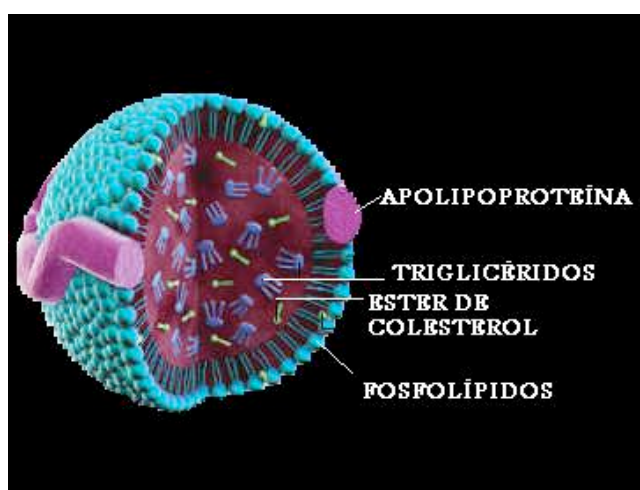


Figura 3. Esquema general de una lipoproteína.

Dependiendo del tamaño, su densidad y el porcentaje de los distintos lípidos, las lipoproteínas se dividen en quilomicrones (QM) y lipoproteínas de alta, baja y muy baja densidad (HDL, LDL y VLDL, respectivamente) (Tabla 1). Las lipoproteínas más abundantes son las LDL y las HDL, que transportan la mayor parte del colesterol del organismo; mientras que los QM y las VLDL transportan mayoritariamente TG.

INTRODUCCIÓN

LIPOPROTEÍNA	QM	VLDL	LDL	HDL
%	2	7	21	46
Principales apolipoproteínas	B-48, A-I, A-II, A-IV, C-I, C-II, C-III, E	A-IV, B-100, C-I, C-II, C-III, E	B-100	A-I, A-II, A-IV, C-I, C-II, C-III, D, E
Triglicéridos (%)	87	64-80	10	2-5
Colesterol (%)	6	8-13	45	20
Fosfolípidos (%)	4	6-15	25	30
Tamaño (nm)	>200	30-200	10-30	<10
Densidad (g/mL)	<0.95	0.95-1.006	1.006-1.063	1.063-1.210
Origen	Lípidos dieta	Lípidos hepáticos	Metabolismo VLDL	Lípidos tejidos
Función	Transporte TG dieta (postprandial)	Transporte TG hepáticos a tejidos periféricos	Transporte de colesterol y fosfolípidos a tejidos periféricos	Transporte reverso de colesterol

Tabla 1. Características físico-químicas y función de las lipoproteínas.

Cada lipoproteína contiene varias apo, de las que se han identificado diferentes familias que se encargan de distintas funciones (Tabla 2).

APOLIPOPROTEÍNA	CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA (mg/dl)	DISTRIBUCIÓN	FUNCIÓN	ORIGEN
AI	100-150	HDL y QM	Activación LCAT	Hígado e intestino
AII	30-50	HDL y QM	Estabilización HDL	Hígado e intestino
AIV	15	QM	Absorción intestinal de lípidos	Intestino
B100	80-100	VLDL,IDL,LDL	Formación de VLDL e interacción con receptores celulares	Hígado
B48	50	QM	Formación de QM	Intestino
CI	10	QM, VLDL, IDL, HDL	Activación de LCAT	Hígado
CII	3-8	QM, VLDL, IDL, HDL	Activación LPL	Hígado
CIII	8-15	QM, VLDL, IDL, HDL	Inhibición LPL	Hígado
D	10	HDL	Transporte CE	Hígado
E	3-5	QM, VLDL, IDL, HDL	Interacción con receptores celulares	Hígado, intestino y otros tejidos

Tabla 2. Apolipoproteínas del plasma humano. Clasificación de las principales apolipoproteínas que forman parte de lipoproteínas. LCAT (lecitín colesterol acil transferasa), LPL (lipoproteín lipasa).

3.2 METABOLISMO DE LAS LIPOPROTEÍNAS

3.2.1 Metabolismo de lípidos exógenos

La incorporación de los lípidos exógenos a nuestro organismo se realiza en tres etapas: digestión, absorción y transporte. Los TG de la dieta son hidrolizados en el intestino en ácidos grasos (AG) y monoglicéridos por la lipasa pancreática. Posteriormente, los AG se reesterifican en los enterocitos para formar TG. Estos TG tras la combinación dentro del aparato de Golgi con apo B-48 y apo A, colesterol y fosfolípidos, originan los QM nacientes.

Los QM nacientes se incorporan a través de los vasos quilíferos de las vellosidades intestinales al sistema linfático, tras lo cual entran en la circulación sanguínea [15]. En la circulación los QM nacientes interactúan con partículas HDL y adquieren apo adicionales, apo-E y apo CII, transformándose en QM maduros. En los tejidos extrahepáticos la apo CII, que transporta los QM maduros, permite la activación del enzima lipoproteín lipasa (LPL), enzima situada en las células endoteliales de los capilares de tejido adiposo y muscular. La LPL digiere los TG del QM produciendo glicerol y AG que penetran mediante difusión [16] o a través de receptores en el tejido muscular [17]. Los AG se utilizan como fuente de energía en el tejido muscular o se almacenan en forma de vacuolas lipídicas en el tejido adiposo [15, 18, 19]. La hidrólisis de los TG conlleva la pérdida de apo C y apo A del QM, el cual se convierte en un QM remanente.

Los QM remanentes, altamente aterogénicos [20], son captados por los hepatocitos gracias a apo E y catabolizados en el hígado. Hay estudios que describen cómo la composición de los QM puede influenciar su interacción con los receptores de la superficie del hepatocito [21]. La apo E facilita la interacción directa de los QM remanentes con el receptor de las LDL (LDL-r) [22, 23], el *LDL receptor-related protein 1* (LRP1) [24, 25] y los proteoglicanos heparán sulfatos (HS-PG) [26, 27]. La LPL [28] y la lipasa hepática [29] interactúan con la apo E en el proceso de captación actuando como ligandos de LRP1 o como cofactores en las uniones apo E-(HS-PG).

Los datos existentes hasta el momento demuestran que la apo E juega un papel fundamental en el aclaramiento de QM remanentes [30, 31] (Figura 4).

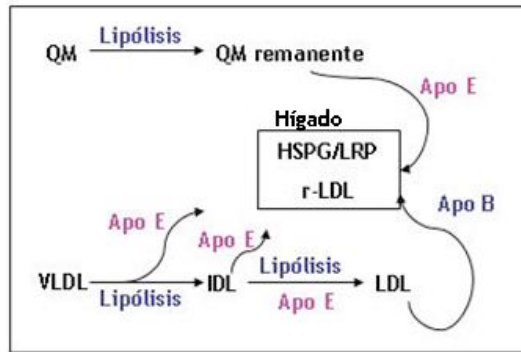


Figura 4. Papel de apo E en el metabolismo lipídico. Los QM secretados en el intestino y las VLDL secretadas en el hígado son digeridas por LPL para convertirse en lipoproteínas remanentes. Apo E media la captación de partículas remanentes en el hígado a través de LDL-r, LRP y HSPG [32].

3.2.2 Metabolismo de lípidos endógenos

El exceso de AG libres provenientes del flujo de lipoproteínas circulantes o de la conversión de carbohidratos a AG libres se reesterifica en el hígado para la formación de TG, que junto a apo B-100, apo E y apo C, y pequeñas cantidades de CE, conlleva la formación de lipoproteínas VLDL en el hígado [33]. El CE hepático para la formación de las VLDL proviene de síntesis de novo a partir de acetil-CoA o de otras partículas lipoprotéicas que son reconocidas por receptores específicos como LDL-r o el *scavenger* B1 [13, 34].

Las VLDL transportan TG endógenos que se hidrolizan a AG por la actividad de la LPL [18]. Además, parte de los TG de las VLDL se intercambian por el CE de las HDL mediante la proteína transportadora de ésteres de colesterol (CEPT). El resultado de estos dos procesos (hidrólisis e intercambio) origina una partícula VLDL remanente o de densidad intermedia (IDL). Las partículas IDL conservan las apolipoproteínas apo B-100, apo C y apo E. En particular, la apo E es reconocida por los receptores hepáticos LDL-r, LRP1 o HS-PG [27] y ello permite que las IDL sean absorbidas por el hígado, se procesen por la lipasa hepática y se originen partículas LDL [35].

Las LDL transportan el 80% del colesterol circulante, tanto libre como esterificado, hacia las células de los tejidos periféricos. La apo B-100 es la única apo de estas partículas que interacciona con el LDL-r de los tejidos periféricos. Las LDL se metabolizan en lisosomas y originan colesterol libre en las células de los tejidos periféricos. Este colesterol libre cumple tres funciones muy importantes: (I) inhibe la síntesis endógena de colesterol mediante la inhibición de la 3-hidroxi-3-metil-glutaril (HMG)-CoA reductasa, (II) impide la entrada de colesterol en las células disminuyendo la expresión de LDL-r y (III) estimula la

síntesis de acetil colesteroil acil transferasa (ACAT), que esterifica el colesteroil libre del citoplasma [36].

El aclaramiento de las LDL se produce en el hígado al ser captadas mediante el LDL-r [36, 37].

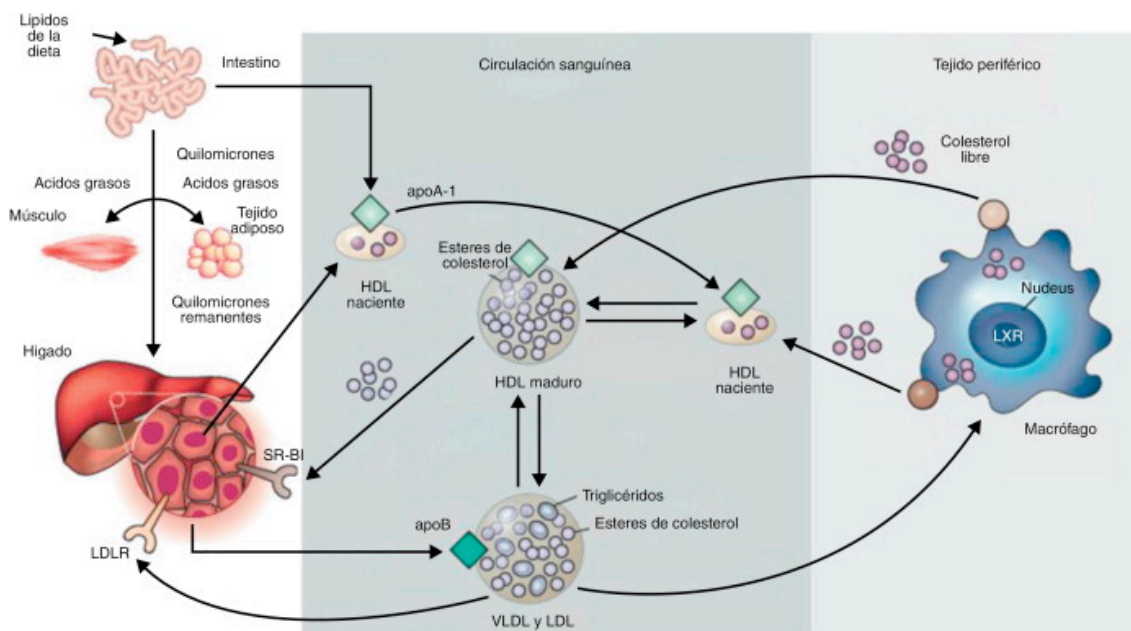


Figura 5. Metabolismo de las lipoproteínas. Adaptado de Rader y Daugherty [13]. Las grasas de la dieta son absorbidas en el intestino y empaquetadas en forma de QM que son transportados a través de la sangre a tejidos periféricos. La LPL del endotelio hidroliza los TG de los QM y permite la captación de AG por el tejido adiposo y en el músculo, los QM remanentes originados son metabolizados en el hígado. En el hígado se forman las VLDL que se encargan del transporte endógeno de colesteroil. Las VLDL se transforman en LDL por medio de la acción de la LPL. Las LDL son captadas en el hígado vía LDL-r. Por otro lado, las HDL son generadas en el intestino y en el hígado y captan colesteroil de los tejidos periféricos a través del transportador ABCA-1.

Finalmente las HDL son captadas por el hígado a través del receptor *scavenger-B1*.

3.2.3 Transporte reverso de colesteroil

Las partículas HDL se forman en el hígado y en el intestino, y participan en el transporte reverso de CE desde los tejidos periféricos hacia el hígado [38]. Las HDL captan colesteroil libre de los tejidos extra hepáticos a través del receptor ABCA-1 (del inglés, *ATP-binding cassette-1*) [39]. El colesteroil libre se esterifica por la acción de la lecitín colesteroil acil transferasa (LCAT) y se acumula en la HDL. Las HDL transportan el CE hacia el hígado donde se capta por el receptor *scavenger-B1* [39, 40]. Las HDL también transfieren colesteroil a partículas VLDL y LDL mediante la acción de la CEPT y lo devuelven al hígado donde

será hidrolizado a través de la lipasa hepática. De esta manera el exceso de colesterol de los tejidos puede reducirse.

3.3 HIPERLIPEMIA

La hiperlipemia incluye todo un conjunto de alteraciones del metabolismo de los lípidos y se caracteriza por un aumento de la concentración de LDL acompañada de una disminución de partículas HDL y/o un aumento de TG. La alteración de la homeostasis lipídica se considera uno de los FRCV más importantes en el desarrollo y progresión de la lesión aterotrombótica [11].

La **hiperlipemia familiar** presenta una expresión fenotípica variable y se caracteriza principalmente por un aumento del colesterol LDL, aunque también puede cursar como una hiperlipemia mixta, con aumento de los niveles de colesterol LDL y TG, o como una hipertrigliceridemia, caracterizada por el incremento de TG.

Como se ha mencionado anteriormente, las partículas LDL son las principales transportadoras de colesterol y un aumento de su concentración en la circulación se asocia directamente con la incidencia de la enfermedad coronaria [7]. En el caso de la **hipercolesterolemia familiar**, la mutación en el LDL-r impide la correcta eliminación de las partículas LDL, aumentando su permanencia en la circulación sanguínea y favoreciendo altos niveles de colesterol LDL en plasma promoviendo la aterogénesis temprana [41].

El colesterol es un componente crucial de la membrana plasmática celular, por ello su síntesis y captación está altamente regulada por los factores de transcripción SREBPs (del inglés, *sterol regulatory element binding protein*) [42, 43]. Cuando aumenta la acumulación de CE intracelular se inhibe la actividad de los SREBPs y la transcripción de sus genes dianas, disminuye la actividad de la HMG-CoA y se reduce el número de LDL-r [43]. Sin embargo, el receptor LRP1, que participa en la captación y acumulación de CE intracelular [44] está regulado negativamente por los SREBPs [45]. Por tanto, en situación de hipercolesterolemia, los niveles de LDL-r son muy bajos y sin embargo los niveles de LRP1 son altos. Por tanto, serían los elevados niveles de LRP1 en las células del sistema cardiovascular la causa de la sobreacumulación de colesterol en la pared vascular.

Las estatinas e inhibidores de la HMG-CoA son los fármacos hipolipemiantes más frecuentemente empleados para disminuir el riesgo cardiovascular. El efecto hipolipemiante de estos fármacos se produce mediante la reducción de los niveles de LDL en plasma. Además, las estatinas activan la síntesis de partículas HDL y por tanto el transporte reverso del colesterol [46]. Si la hipercolesterolemia no se trata, los altos niveles de colesterol LDL junto con los bajos niveles de colesterol HDL favorecen el desarrollo de la lesión aterosclerótica. Las partículas HDL juegan además un papel importante en la inhibición de la activación del factor tisular (TF) [47] y en la inhibición de la agregación plaquetaria [48].

La **hipertrigliceridemia** puede estar causada por una deficiencia genética de LPL, que impide el aclaramiento de QM y VLDL remanentes altamente aterogénicos de la circulación. El aumento de TG en sangre suele relacionarse con una disminución de HDL y una presencia mayoritaria de una LDL pequeña y densa, con más potencial aterogénico [49]. Apo E tiene una función anti-aterogénica al promover el aclaramiento de lipoproteínas ricas en TG de la circulación sanguínea [50, 51]. Por ello, los modelos animales deficientes en apo E presentan una mayor predisposición a padecer aterosclerosis [52].

3.4 LDL MODIFICADAS

La lesión aterosclerótica se inicia con la infiltración en la pared arterial de LDL nativas (LDL_n) que no presentan características aterogénicas. Sin embargo, en el espacio subendotelial, se alteran las propiedades fisicoquímicas de las LDL, modificándose y adquiriendo características aterogénicas [53]. Estas alteraciones se producen porque en el espacio subendotelial, los proteoglicanos de la íntima retienen las LDL_n y promueven modificaciones como la oxidación, la lipólisis o la agregación. Estas modificaciones provocan una mayor retención de LDL_n y promueven la respuesta inflamatoria que causa la evolución de la lesión [54].

Los proteoglicanos (PG) son el principal componente de la íntima y conforman la matriz extracelular (MEC). Los PG se clasifican según los glicoaminoglicanos (GAG) que contienen. Los PG son componentes biológicamente muy activos que participan en el control de la permeabilidad, la homeostasis y las propiedades físicas de la pared arterial. En la íntima, los PG forman parte del espacio pericelular o son secretados por células endoteliales, VSMCs, linfocitos y monocitos. El PG estructural más importante de la MEC es el versicán, un condroitin sulfato PG (CS-PG).

INTRODUCCIÓN

Los GAG de los PG tienen cargas negativas que interactúan electrostáticamente con las cargas positivas de la apo B-100 y apo E de las LDLn, favoreciendo así su retención y modificación [55]. Además, las VSMCs secretan HS-PG que también retienen LDLn [56]. Las LDLn retenidas interactúan entonces con otros componentes de la MEC, agentes oxidantes (radicales libres), enzimas proteolíticas (MMPs, trombina), enzimas lipolíticas (PLA₂, fosfolipasa C) y/o con enzimas hidrolíticas (esterasas). Las modificaciones de las LDL incluyen procesos químicos y estructurales que provocan su agregación (LDLag), oxidación (LDLox) y glicosilación (Tabla 3). Nuestro grupo demostró que las LDLag formadas por la interacción de LDLn con versicán son similares a las LDLag que se obtienen con agitación mecánica intensa (Figura 6) [57, 58].

MODIFICACIÓN LDL	REFERENCIAS	MODIFICACIÓN LDL	REFERENCIAS
Interacción con PGs	[59, 60]	Degradación por hidrólisis	[61]
Glicosilación	[62]	Acetilación	[63, 64]
Agregación	[58, 65, 66]	Actividad por grupos tiol	[67]
Oxidación	[68, 69]	Carbamilación	[70, 71]
NEFA-LDL	[72]	MDA-LDL	[73]

Tabla 3. Algunas de las modificaciones más importantes de las partículas LDLn.

NEFA-LDL (LDLn enriquecida en ácidos grasos no esterificados), MDA-LDL (LDLn modificada con malondialdehído).

Las LDL modificadas son captadas por VSMCs y macrófagos a través de distintos receptores no regulados por el colesterol intracelular, promoviendo la formación de células espumosas con alto contenido lipídico.

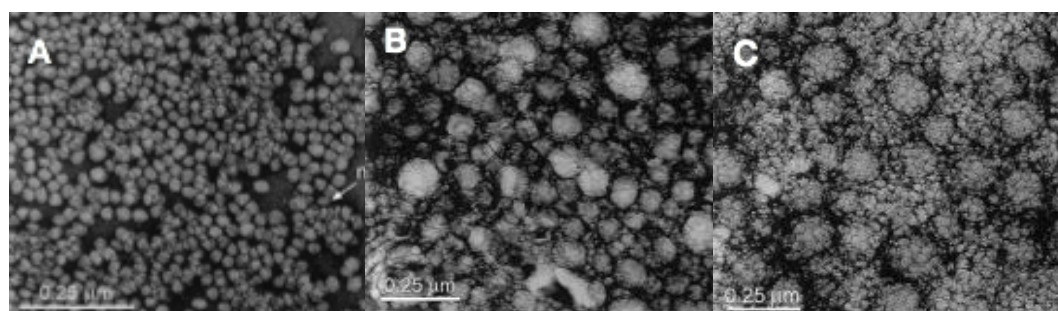


Figura 6. Microscopía electrónica de LDL. Diferencias en la estructura de (A) LDLn, (B) LDLag agregadas mecánicamente mediante agitación vortex y (C) LDLag agregadas mediante tratamiento con versicán [58].

4. PARED VASCULAR

La pared vascular arterial (Figura 7) se compone de tres capas: una túnica íntima con un revestimiento interno de células epiteliales extraordinariamente aplanadas (endotelio), situadas sobre una membrana basal y un delicado tejido de colágeno; una túnica media constituida por una capa muscular intermedia; y una túnica adventicia o capa externa de tejido de sostén.

La monocapa de células endoteliales por su parte luminal se encuentra en contacto con el sistema circulatorio, mantiene el tono vascular y la homeostasis, y crea una superficie no trombogénica por su capacidad de sintetizar inhibidores de la agregación plaquetaria. El endotelio por su zona basal interacciona con los componentes de la MEC que conforman la íntima arterial.

La túnica media, la más gruesa de la pared vascular, está separada de la íntima por la lámina elástica interna. La túnica media no está tan desarrollada en las venas como en las arterias y en los capilares es casi inexistente. Las VSMCs, células mayoritarias de la túnica media, están orientadas de manera circular al eje del lumen. Estas células tienen un fenotipo contráctil y se contraen y relajan con los cambios de diámetro del vaso. Además, a diferencia de las células musculares cardíacas, las VSMCs pueden proliferar y reparar posibles daños en la pared vascular. La MEC de la túnica media es muy rica en fibras de elastina, que producen las propias células musculares.

Por último, la lámina elástica externa separa la media de la adventicia. La túnica adventicia es la capa más externa de la pared vascular y está constituida por fibras de colágeno y fibras elásticas. Es la capa por la que circulan los propios vasos sanguíneos, *vasa vasorum*, que irrigan los vasos de gran calibre.

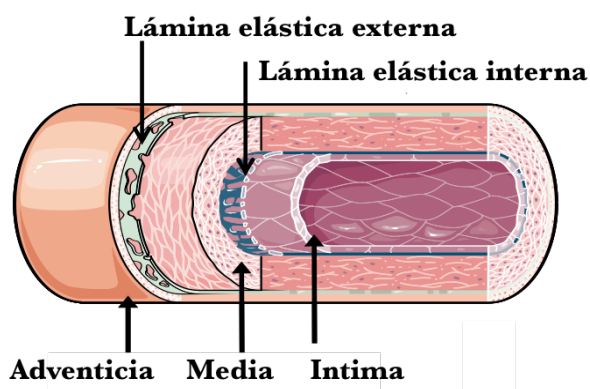


Figura 7 . La pared vascular. Estructura de la pared vascular.

5. FISIOPATOLOGÍA DE LA ATEROSCLEROSIS

Hoy en día está bien establecido que la aterosclerosis tiene una base etiopatogénica multifactorial, pero no siempre ha sido así, durante años prevalecieron otras ideas, como la hipótesis trombótica y la teoría lipídica. La hipótesis trombótica o de la Incrustación fue desarrollada por Rokitansky en 1852, quien defendía que las placas ateroscleróticas se originaban a partir de los depósitos de fibrina de la íntima, y que esta fibrosis inicial era el resultado de un trombo plaquetario que se terminaba incorporando a la pared vascular produciendo el engrosamiento de la íntima. Sin embargo, en 1862, Virchow elaboró la teoría lipídica o de la Insudación en la cual describía que la aterosclerosis es una enfermedad intrínseca de la pared vascular cuyo origen se encontraba en la respuesta tisular a agentes nocivos de la sangre que producían una respuesta inflamatoria. Además, este autor enfatizaba que existía una relación entre la elevación crónica de colesterol sérico y la producción de la lesión aterosclerótica.

Actualmente, la respuesta crónica al daño formulada por Ross y Glomset (1976), que defiende que el inicio de la lesión aterosclerótica se origina con la lesión en el endotelio, es la más reconocida [74, 75]. Asimismo, también está muy aceptado que los factores claves participantes en el inicio y desarrollo de la lesión aterosclerótica son la inflamación, la disfunción endotelial y la hiperlipidemia [11, 76].

5.1 Disfunción endotelial

El endotelio es el principal regulador de la homeostasis vascular debido a su capacidad de sintetizar óxido nítrico (NO). La capacidad ateroprotectora del NO se debe a sus características vasodilatadoras, antioxidantes y a su capacidad de inhibir la agregación plaquetaria, la adhesión e infiltración de leucocitos y la proliferación de VSMCs [77]. A su vez, el NO previene la oxidación del colesterol LDL [78], mecanismo propuesto como uno de los principales precursores del proceso aterosclerótico [79].

En presencia de hipertensión e hipercolesterolemia, se altera la síntesis de NO lo que provoca un desequilibrio entre el efecto vasodilatador del NO y el vasoconstrictor de la endotelina y la angiotensina II (AngII) [77, 80] (Tabla 4). La pérdida de este equilibrio promueve un aumento de la permeabilidad vascular y como consecuencia un aumento de la expresión y secreción de citoquinas proinflamatorias, como la interleuquina-1 (IL-1), y de

moléculas de adhesión celular (CAM) que actúan como receptores de leucocitos circulantes. Las zonas del vaso con lesión tienen una mayor expresión de CAM y de la proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1), lo que facilita la adhesión y la migración de los monocitos a las áreas de lesión [81].

SUSTANCIAS SINTETIZADAS POR CÉLULAS ENDOTELIALES	
PRO-ATEROGÉNICAS	ANTI-ATEROGÉNICAS
Vasoconstrictoras AngII, endotelina, tromboxano, serotonina, trombina...	Vasodilatadoras Postaciclina, histamina, bradicinina, serotonina, sustancia P
Activadoras de las VSMC PDGF, endotelina, AngII	Inhibidores de las VSMC Óxido nítrico, prostaciclina, bradicinina, TGF-β
Pro-trombóticas Tromboxano, trombina	Anti-trombóticas Trombomodulina, TFPI, tPA, PAI-I
Pro-inflamatorias VCAM, ICAM, ELAM, selectinas	Anti-inflamatorias Óxido nítrico

Tabla 4. Sustancias liberadas por el endotelio. La disminución en la biodisponibilidad de las moléculas anti-aterogénicas, es lo que caracteriza la disfunción endotelial. AngII, angiotensina II; PDGF, del inglés *Platelet-derived growth factor*; TGF-β, del inglés *Transforming growth factor beta*; TFPI, del inglés *Tissue factor pathway inhibitor*; tPA, del inglés *Tissue plasminogen activator*; PAI-I, del inglés *Plasminogen activator inhibitor I*; VCAM, del inglés *Vascular cell adhesion molecule*; ICAM, Intercelular adhesion molecule; ELAM, del inglés *Endothelial-leukocyte adhesion molecule*.

5.2 Desarrollo de la lesión aterosclerótica

5.2.1 Inicio de la lesión

Las ramificaciones o curvaturas de los vasos son las zonas más susceptibles de desarrollar una lesión aterosclerótica debido a los cambios en la velocidad y turbulencia de la sangre circulante [82]. Las turbulencias mecánicas junto con la acción biológica de otros factores de riesgo como la hipercolesterolemia e hipertensión provocan la disfunción endotelial, promoviendo el transporte de material lipídico hacia la íntima arterial. Las LDLn difunden pasivamente entre las uniones de las células endoteliales y quedan retenidas en la íntima arterial al interactuar con los PG de la MEC. Cuanto más tiempo son retenidas en la red de PG, más posibilidades tienen de ser modificadas por oxidación, lipólisis, proteólisis o agregación, contribuyendo tanto al proceso inflamatorio como a la formación de células espumosas [12]. Una de las modificaciones principales de las LDL es la oxidación que se produce por la acción de aniones superóxido producidos por las células endoteliales y los macrófagos infiltrados. El resultado es la una generación de lípidos biológicamente activos

con carácter pro-inflamatorios que inician y mantienen el proceso inflamatorio en la íntima. Esta inflamación genera quimioquinas como CX3CL1 y MCP-1/CCL-2 que inician el reclutamiento de monocitos a la íntima. Además, las LDLox son citotóxicas para las células endoteliales inhibiendo la respuesta vasodilatadora mediada por NO acrecentando la disfunción endotelial [83]. Debido a su carácter altamente inflamatorio y citotóxico, las LDLox se consideran esenciales para la progresión del proceso aterosclerótico [84, 85].

El reclutamiento de monocitos es otro de los primeros eventos que suceden en la formación de la placa aterosclerótica. Se sabe que solamente determinadas poblaciones de monocitos migran hacia la íntima [86]. En primer lugar, se produce el *rolling* de monocitos circulantes a lo largo de la superficie del endotelio como consecuencia del aumento de la expresión de selectinas E y P y de moléculas de adhesión (VCAM-1 e ICAM-1) en la membrana de las células endoteliales [87, 88]. Los monocitos realizan la migración siguiendo el gradiente de señales quimioatrayentes MCP-1/CCL-2 y CCL-5. En particular, CCL-2 juega un papel muy significativo en el desarrollo de la lesión, ya que se ha demostrado que la deficiencia de CCL-2 o de su receptor (CCR-2) reduce la presencia de lesiones ateroscleróticas [89, 90].

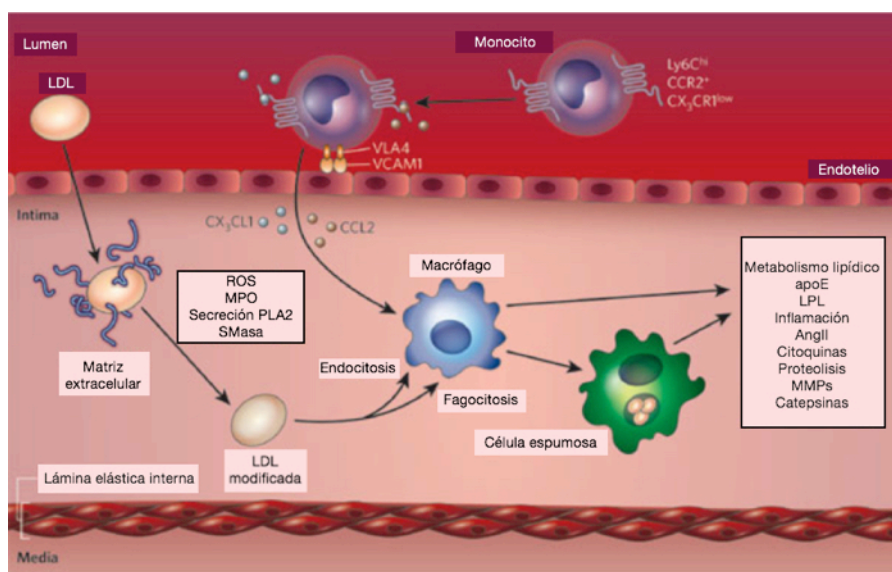


Figura 8. Reclutamiento de monocitos y formación de células espumosas. Las LDLn circulantes penetran en la íntima, donde son retenidas por PG de la MEC y modificadas. Las LDL modificadas activan la repuesta inflamatoria a través de quimioquinas que reclutan monocitos hacia la íntima. Los monocitos que se diferencian a macrófagos captan LDL modificadas por fagocitosis o endocitosis y se transforman en células espumosas. Estas células secretan factores involucrados en el desarrollo de la placa aterosclerótica. ROS, del inglés, *reactive oxygen species*; MPO, mielina peroxidasa; PLA2, del inglés, *phospholipase 2*; SMasa, del inglés, *sphingomyelinase*; LPL, del inglés, *lipoprotein lipase*; AngII, angiotensina II; MMPs, metaloproteinasas. Adaptado de Rader & Daugherty, 2002 [13].

Una vez en la íntima, los monocitos maduran a macrófagos debido a la acción de agentes como el factor estimulante de colonias de monocitos (M-CSF) y $\text{TNF}\alpha$. Los macrófagos infiltrados producen factores como CD40 y CD40 ligando (CD40L), $\text{TNF}\alpha$, IL-6 e IL-1 β , y aniones superóxido que perpetúan la disfunción endotelial, favoreciendo la entrada de más partículas LDLn y monocitos al subendotelio [85]. Además, los macrófagos maduros en la íntima incrementan la expresión de receptores *Toll-like* (TLRs) que participan en el inicio de respuestas inmunes innatas que perpetúan la respuesta inflamatoria [91, 92] y la expresión de receptores *scavengers* que facilitan la transformación de los macrófagos en células espumosas [93, 94]. Los receptores *scavengers*, al contrario que otros receptores lipoprotéicos, no se regulan a la baja por la acumulación intracelular de colesterol y permiten a los macrófagos captar grandes cantidades de LDLox. Los receptores *scavenger* A y CD36 parecen jugar un papel muy importante en estos procesos ya que se ha demostrado que los ratones deficientes en estos receptores tienen menos lesiones ateroscleróticas [95, 96].

Además de los monocitos, los linfocitos T también migran hacia la íntima arterial en situación de aterosclerosis. En la íntima, los linfocitos T interactúan con macrófagos presentadores de antígenos y esta interacción puede ser pro- o anti- inflamatoria. Los linfocitos T *helper* 1 (Th1), predominantes en las lesiones ateroscleróticas, producen una respuesta pro-inflamatoria mediante la secreción de interferón- γ (IFN- γ). El IFN- γ activa a los macrófagos de la íntima promoviendo el proceso inflamatorio [97]. En cambio, los linfocitos T *helper* 2 (Th2) producen una respuesta anti-inflamatoria, al secretar citoquinas tales como IL-4 e IL-13. Los linfocitos T-*regulatory* pueden también secretar citoquinas anti-inflamatorias IL-10 [98] y TGF- β [99] que pueden llegar a compensar la inflamación en la placa.

La progresión de la placa aterosclerótica estará regulada en gran medida por el balance entre el componente anti- y pro- inflamatorio de la lesión aterosclerótica.

5.2.2 Progresión de la lesión aterosclerótica

Si no se neutraliza el proceso inflamatorio y los factores que promueven la lesión persisten, la estría grasa evoluciona y la placa de ateroma sigue desarrollándose debido a la migración de VSMCs y la acumulación lipídica. La placa de ateroma es el estadio intermedio entre la estría grasa y la constitución de la placa vulnerable.

Las VSMCs de la túnica media tienen un fenotipo contráctil manteniendo la tonalidad del vaso. En presencia de estímulos aterogénicos como citoquinas pro-inflamatorias y material lipídico, las VSMCs pierden el fenotipo contráctil y adquieren un fenotipo sintético. Las VSMCs con fenotipo sintético tienen una alta capacidad de proliferación y migración desde la túnica media hacia la íntima [100]. La activación de metaloproteinasas (MMPs) de matriz extracelular secretadas por monocitos, macrófagos y las propias VSMCs favorecen la migración de las VSMCs al degradar los componentes de la MEC [101]. Las gelatinasas MMP-2 [102] y MMP-9 [103] juegan un rol muy importante en la migración de VSMCs ya que la deficiencia de estas MMPs retrasa la formación de la íntima arterial en el modelo murino. La migración de las VSMCs con fenotipo sintético permite el engrosamiento de la íntima y la reducción del lumen arterial.

Las VSMCs pueden además captar y acumular intracelularmente CE procedente de la captación de LDLag. Las LDLag se captan a través de receptores lipoproteicos como LRP1 y tienen una alta capacidad para promover la formación de células espumosas a partir de VMSCs [58, 104] y macrófagos [105, 106]. A pesar de la convicción de la que la mayoría de las células espumosas provienen de macrófagos, se ha publicado recientemente que más de un 50% de las células espumosas consideradas originalmente macrófagos, tienen en realidad su origen en células musculares lisas [107].

La migración de las VSMCs complica la lesión aterosclerótica ya que al engrosar la íntima arterial favorece la reducción del lumen del vaso, proceso conocido como estenosis. Sin embargo, la migración de las VSMCs también permite la formación de una cubierta fibrosa alrededor del núcleo lipídico que estabiliza y protege la placa aterosclerótica de la ruptura [108].

Nuestro grupo demostró en el año 2008 que la capacidad migratoria de las VSMCs dependía de su contenido lipídico, ya que las VSMCs con alto contenido lipídico intracelular tenían una capacidad migratoria reducida [109]. Por tanto, VSMCs con alto contenido de lípido intracelular promueven un bajo contenido de VSMCs en la cubierta fibrosa. Un gran número de evidencias experimentales han demostrado que el grosor de la cubierta fibrosa determina la tendencia de la placa a la ruptura y la trombogeneicidad de la placa, ya que separa el *core* lipídico trombogénico de las plaquetas circulantes y otros factores de coagulación.

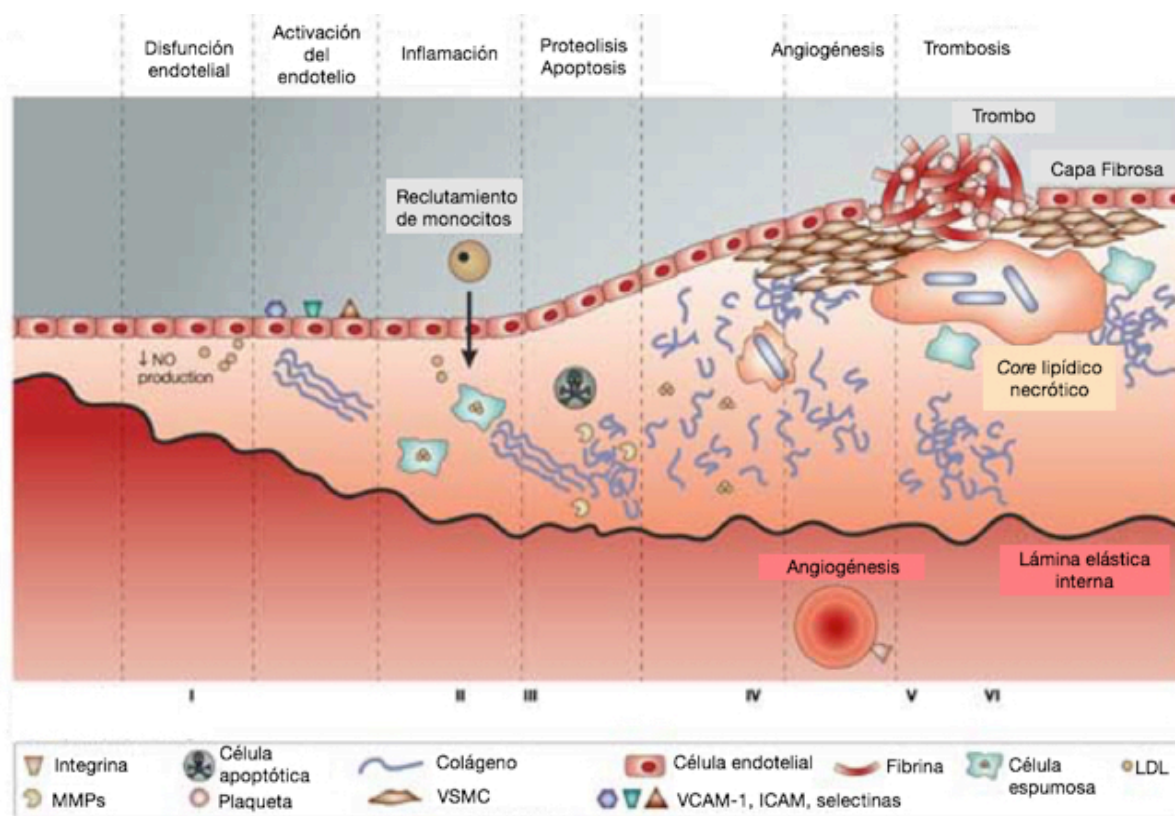


Figura 9. Inicio y progresión de la placa aterosclerótica. De izquierda a derecha, representación de las distintas fases del desarrollo de la lesión aterosclerótica. Adaptado de Choudhury, 2004 [110].

5.2.3 Vulnerabilidad de la placa

Hay varios factores que condicionan la vulnerabilidad y la ruptura de la placa y existen varios criterios para definir su vulnerabilidad [111]. Las placas con menor contenido lipídico son las más estables y las menos susceptibles a la ruptura debido a que el contenido lipídico y el grosor de la cubierta fibrosa son indirectamente proporcionales [112]. La ruptura suele darse donde la cápsula fibrosa es más fina o está erosionada debido a la presión sanguínea causada por la hipertensión y la reducción del lumen arterial [101, 113].

La sobreexpresión del LRP1 en las VSMCs puede contribuir a la ruptura de la placa aterosclerótica al favorecer un incremento de la expresión y liberación de factor tisular por las VSMCs [114], un desequilibrio entre la síntesis y la degradación de tropoelastina [115] y una disminución de la capacidad migratoria de las VSMCs [109].

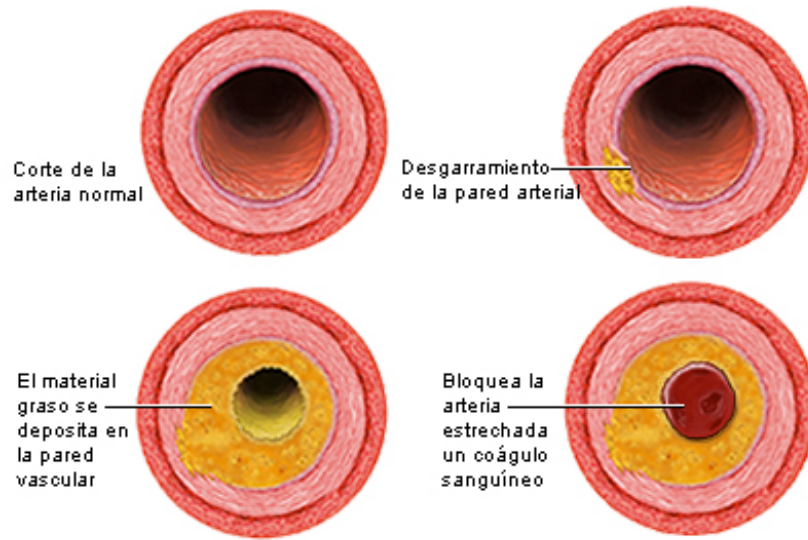


Figura 10. Evolución del proceso aterosclerótico.

6. RECEPTORES LIPOPROTEICOS

Los principales receptores que se expresan en las lesiones ateroscleróticas pertenecen a la familia de receptores *scavenger* y a la familia del receptor de las LDL (LRP1 y el receptor de las VLDL (VLDL-r)). En cambio, los niveles del receptor clásico de las LDL, el LDL-r, son muy bajos en las lesiones ateroscleróticas.

6.1 Receptores *scavengers*

Los receptores *scavengers* (SR) son una amplia familia de proteínas de estructura diversa y que participan en una gran variedad de procesos biológicos. Según PrabhuDas *et al.* los SR podrían definirse como “receptores de la superficie celular a los que normalmente se unen múltiples ligandos y promueven la eliminación de dianas propias alteradas o no propias”. “Los SR funcionan por mecanismos que incluyen la endocitosis, fagocitosis, adhesión y señalización, procesos que finalmente conducen a la eliminación de sustancias perjudiciales” [116]. Originalmente, los SR se describieron en un contexto aterosclerótico [117], pero actualmente se sabe que intervienen también en otros procesos como la respuesta inmune [118]. Existen hasta ocho clases de SR (clases A-H), pero las clases A y B se expresan de forma más elevada en placas ateroscleróticas.

Los SR de clase A se expresan sobretodo en macrófagos. El receptor SR-A4 media la endocitosis de lipoproteínas y el reconocimiento, internalización y degradación de LDLox por células vasculares endoteliales [116]. Los SR de clase B incluyen receptores ampliamente conocidos: SR-BI, SR-BII, CD36 y LIMP2.

El SR-BI fue el primer receptor de HDL identificado [119] y juega un papel fundamental en el transporte reverso de colesterol. Tiene actividad ateroprotectora ya que su eliminación total en ratones *knockout* apo E produce aterosclerosis coronaria, infarto de miocardio y la muerte [120]. Además, la interacción de SR-BI con HDL en el endotelio produce la activación de la eNOS, generando NO ateroprotector que mantiene la integridad del endotelio [121, 122].

El grupo del Dr. Endemann fue el primero en caracterizar el SR CD36 como el receptor de LDLox [123]. El CD36 se expresa en gran variedad de células, como macrófagos, monocitos, plaquetas, miocitos cardiacos y células endoteliales entre otras, y participa en

diversos aspectos de la biología del macrófago, que incluyen el metabolismo lipídico, la aterosclerosis, la inflamación y la angiogénesis [124, 125]. Con respecto al metabolismo lipídico, el CD36 permite la translocación de AG de cadena larga, importantes en el requerimiento energético de corazón y músculo esquelético [125].

La implicación de CD36 en el proceso aterosclerótico ha sido ampliamente estudiada. Se ha demostrado que los macrófagos aislados de ratones *null* (deficientes) en CD36 no son capaces de captar LDLox y no se transforman en células espumosas [95]. Por ello se considera que la transformación de los macrófagos en células espumosas se produce principalmente por la captación de LDLox a través de CD36 (Figura 11). Además, la LDLox activa la vía de señalización de CD36 produciendo la retención de macrófagos en la placa de aterosclerosis y contribuyendo al desarrollo y al agravamiento de la lesión [126].

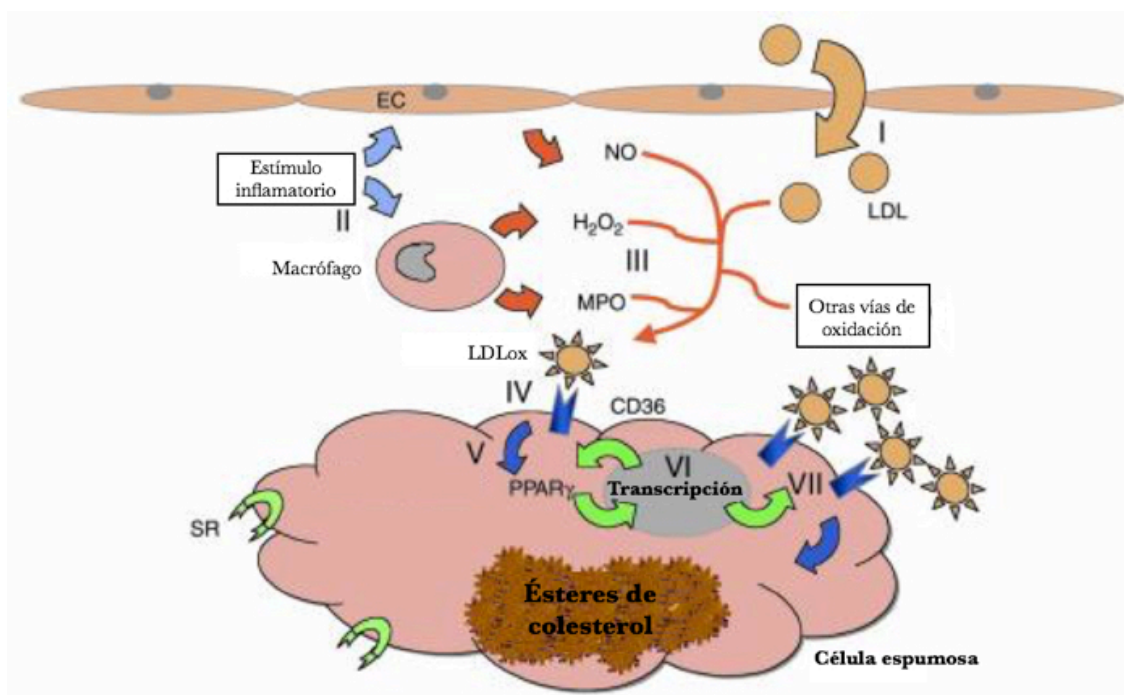


Figura 11. CD36 media la formación de células espumosas a partir de macrófagos. En respuesta a la disfunción de las células endoteliales (EC), se produce la entrada de LDL y macrófagos al espacio subendotelial (I). Estímulos inflamatorios permiten la secreción de productos oxidativos por parte de EC y macrófagos (II) que actúan sobre las LDL modificándolas (III). Las LDLox son captadas por los SR CD36 (IV) y activan vías de señalización que permiten la translocación de PPAR γ al núcleo del macrófago (V), activando la transcripción de distintos genes diana (VI), como CD36 y PPAR γ y provocando una retroalimentación positiva. Este proceso conduce por tanto a una captación exacerbada de LDLox y a la acumulación intracelular de CE con la consecuente transformación del macrófago en células espumosa (VII). Modificado de Febbraio 2001 [125].

6.2 Familia de receptores de las LDL

La familia de los receptores de LDL incluye toda una serie de receptores endocíticos de superficie celular que son capaces de unir e internalizar gran variedad de ligandos extracelulares. Los distintos receptores de esta familia poseen en su estructura motivos comunes (Figura 12). De entre todos ellos, LDL-r, VLDL-r y LRP1 juegan un papel clave en la homeostasis del colesterol y en el metabolismo lipídico.

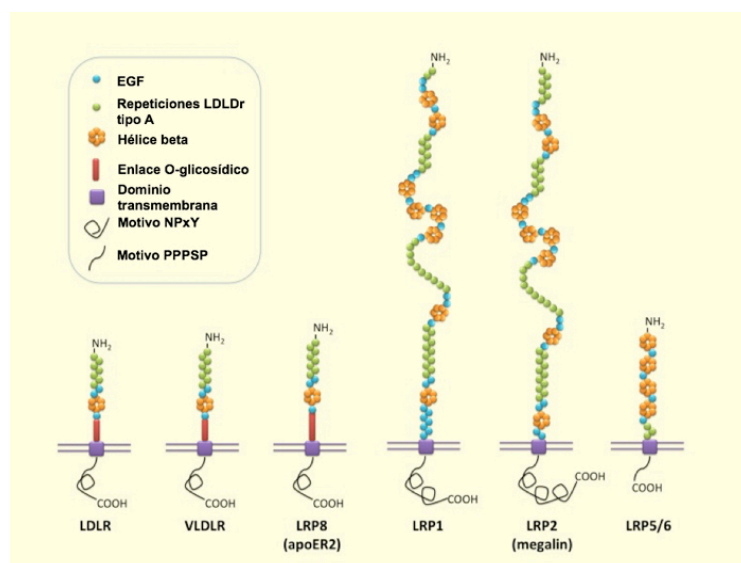


Figura 12. Familia del receptor de las LDL. Modificado de Go, 2012 [127].

6.2.1 LDL-r

El receptor clásico LDL-r se expresa en una gran variedad de tipos celulares. En 1974 el LDL-r fue caracterizado y descrito como un receptor esencial para la endocitosis de lipoproteínas y el metabolismo lipídico [128]. El reconocimiento de las apolipoproteínas va seguido de la unión e internalización gracias a la proteína adaptadora ARH (del inglés, *autosomal recessive hypercholesterolemia protein*). La condición ácida de los endosomas permite la liberación de la lipoproteína del receptor, el cual se recicla y vuelve a la superficie celular, mientras que la lipoproteína se digiere en el lisosoma (Figura 13). El colesterol internalizado reduce la biosíntesis de colesterol y la transcripción del LDL-r al inhibir a SREBP-2. Por otro lado, PCSK9 (del inglés, *proprotein convertase subtilisin/kexin type 9*) puede interactuar con el LDL-r y dirigirlo al lisosoma para su degradación en vez de ser reciclado a la membrana celular [127, 129].

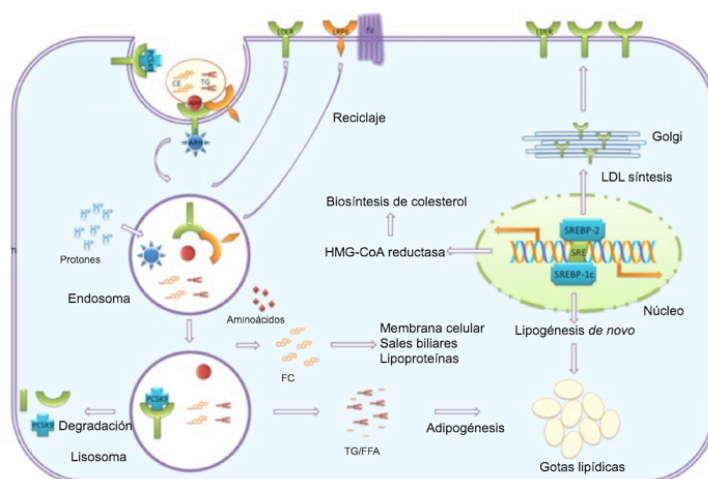


Figura 13. Homeostasis del colesterol celular. Modificado de Go, 2012 [127].

La deficiencia o inhibición de LDL-r [130] o ARH [131] impide el correcto aclaramiento de las LDL y provoca hiperlipemia. Por el contrario, la falta de función de PCSK9 reduce el nivel de LDL en plasma al aumentar la expresión de LDL-r [132]. En este último mecanismo se basan los nuevos fármacos (inhibidores PCSK9) que están emergiendo como potentes drogas hipolipemiantes.

6.3 Receptor de las VLDL (VLDL-r)

El receptor VLDL-r presenta una gran homología estructural con el LDL-r, pero se diferencia tanto en los ligandos como en su distribución tisular. El VLDL-r se expresa de forma abundante en corazón, músculo, tejido adiposo y cerebro [133].

Diversos estudios describen la importancia del VLDL-r en el metabolismo postprandial ya que este receptor participa activamente en la eliminación de lipoproteínas remanentes con apo B y apo E derivadas de QM y VLDL [134]. Su deficiencia en ratones produce una disminución del catabolismo de los QM [135] y un aumento de los niveles de TG en plasma [136].

El VLDL-r está también implicado en la formación de células espumosas tanto a partir de macrófagos [137] como de VSMC [107, 138]. Además se ha demostrado que la deficiencia de VLDL-r promueve el engrosamiento de la íntima después de una lesión vascular [139]. Se considera que ambos procesos se deben a que la expresión del VLDL-r no se regula a la baja por los altos niveles intracelulares de colesterol [140].

6.4 LDL receptor-related protein 1 (LRP1)

El LRP1 tiene capacidad para unir más de 40 ligandos distintos. Es un receptor que se expresa en diversos tejidos y tipos celulares, participando por tanto en diversos procesos biológicos, como el metabolismo lipídico, la migración celular, la degradación de proteasas y el crecimiento celular entre otros muchos [141]. El LRP1 fue descubierto por Joaquim Herz en 1988, fue descrito como un receptor de la superficie celular, altamente expresado en hígado y con similitudes estructurales y bioquímicas al LDL-r [142].

Fue su descubridor quien también describió en 1990 el procesamiento del LRP1. El LRP1 se sintetiza en el retículo sarcoplásmico (RS) como un precursor transmembrana glicosilado de 600 kDa que es procesado en el aparato de Golgi para originar dos cadenas unidas por un enlace no covalente: una cadena α extracelular de 515 kDa y una cadena β citoplasmática de 85 kDa [143].

Estructuralmente, es un receptor formado por 4 dominios extracelulares, un dominio transmembrana y un dominio intracitoplásmico. Los dominios extracelulares están constituidos por repeticiones ricas en cisteínas y repeticiones del factor de crecimiento epidérmico (EGF) separadas por regiones espaciadoras β -propeller [141] (Figura 14).

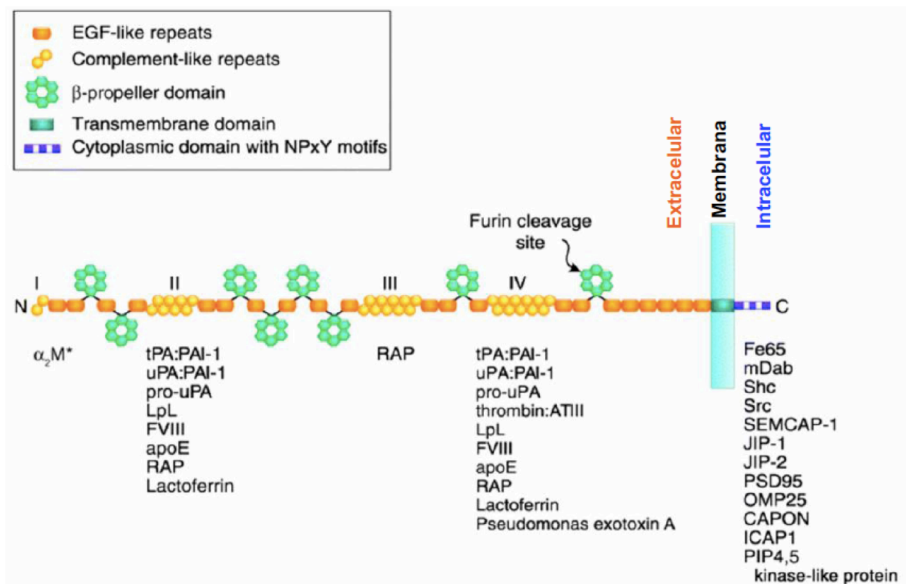


Figura 14. Estructura del receptor LRP1.

INTRODUCCIÓN

Los dominios 2 y 4 son los que más ligandos unen y los que le confieren su multifuncionalidad (tablas 5 y 6).

PROCESO BIOLÓGICO	REFERENCIA	PROCESO BIOLÓGICO	REFERENCIAS
Función hepática	[27, 144]	Inflamación	[145, 146]
Respuesta inmune	[147, 148]	Formación células espumosas	[105, 149]
Migración celular	[109, 150]	Enfermedad de Alzheimer	[151, 152]
Metabolismo lipídico	[25, 153]	Diabetes	[154, 155]

Tabla 5. Procesos biológicos en los que se encuentra implicado el receptor LRP1.

LIGANDOS LRP1	
<p>Proteínas involucradas en el metabolismo lipoproteico</p> <p>Lipasa hepática, lipoproteína lipasa, β-VLDL, proteína activadora de esfingolípidos, lipoproteínas ricas en apoE, LDL agregadas</p>	<p>Proteasas y complejos proteasa/inhibidor</p> <p>α-2 Macroglobulina activada, proteína precursora del β-amiloide, MMP9, MMP13, aprotinina, trombina/proteasa nexin-1, PAI-1, trombina/antitrombina III, factor IXa, fVIII/fIIa, C1s/inhibidor C1q, tXIIa/proteasa nexin-1, proteasa/inhibidor proteína C, trombospondina-2/MMP2, elastasa/α-1 antitripsina, tPA, tPA/PAI-1, TFP1, Neuroserpina, trombina/PAI-1, trombina/heparin cofactor II.</p> <p>Factores de crecimiento</p> <p>PDGF, Midkina, TGF-β, CTGF</p>
<p>Proteínas intracelulares</p> <p>RAP, Calreticulina, Proteína Tat HIV</p>	
<p>Proteínas de matriz extracelular</p> <p>Trombospondina-1,2; Fibronectina</p>	
<p>Otras</p> <p>Lactoferrina, gentamicina, polimixina B, ricina A, exotoxina A de Pseudomonas, saposina, complemento C3, colectina, péptido β-amiloide, proteína circunsporozito, rinovirus</p>	

Tabla 6. Ligandos del receptor LRP1 [141].

6.4.1 LRP1 en la aterosclerosis

La implicación de LRP1 en el proceso aterosclerótico es controvertido dado que existen estudios que describen el receptor LRP1 como anti-aterogénico y en cambio otros demuestran que es un receptor pro-aterogénico.

Según los estudios de Boucher *et al*, el LRP1 juega un rol anti-aterogénico importante. Este grupo demostró que la deficiencia de LRP1 en VSMCs de ratón causaba la progresión de la lesión aterosclerótica y ruptura de la pared vascular. Por tanto, este grupo propuso el LRP1 como un receptor que modula la integridad de la pared vascular y previene el desarrollo de aterosclerosis [156]. Recientemente también han demostrado que la

deficiencia de LRP1 en VSMCs produce masivamente células espumosas en ratones alimentados con una dieta hipercolesterolémica [157]. El aumento del desarrollo de lesión aterosclerótica en ratones con delección de LRP1 en macrófagos también evidencia su papel ateroprotector [158].

Existen otros estudios que muestran el carácter proaterogénico de altos niveles vasculares de LRP1 causados por factores de riesgo cardiovascular tales como la hipercolesterolemia [159, 160], la hipertensión [161] y la hipoxia [162, 163]. El LRP1 se encuentra sobreexpresado en lesiones ateroscleróticas, tanto en modelos animales [164] como en humanos [165, 166]. Nuestro grupo demostró que la expresión de LRP1 está muy aumentada en lesiones ateroscleróticas avanzadas con alto contenido lipídico [159]. Una de las causas de esta sobreexpresión es que la dislipemia, al disminuir los niveles de SREBP-2, incrementa la expresión de LRP1 [149, 166, 167]

Entre los años 2002 y 2008, nuestro grupo describió cómo el versicán, principal PG de la MEC, agregaba las partículas LDL [58] y las convertía en LDLag. Las LDLag son avidamente captadas por el receptor LRP1. La captación selectiva de CE de las LDLag mediante el LRP1 es crucial para la acumulación intracelular de CE en VSMCh [44]. Tanto las LDLag *in vitro* como la hipercolesterolemia *in vivo* [159], aumentan la expresión de LRP1 en VSMCs en lesiones ateroscleróticas [160], favoreciendo la formación de células espumosas a partir de VSMCs [149, 168]. La AngII, hormona vasoactiva asociada a hipertensión, aumenta también la expresión de LRP1 y la captación de LDLag en VSMCs [161], favoreciendo también la formación de células espumosas a partir de VSMCs en la pared vascular.

A parte de su participación en la formación de células espumosas, nuestro grupo ha descrito un importante papel del LRP1 en el remodelado vascular. La acumulación intracelular de colesterol en VSMCs provoca un desequilibrio entre síntesis y degradación de la tropoelastina (TE), precursor de la elastina, produciendo una alteración en las propiedades mecánicas de la pared vascular [115]. La acumulación intracelular de colesterol en VSMCs también disminuye la capacidad migratoria de VSMCs al reducir la expresión y actividad de la MMP9 [109]. Estas alteraciones favorecen una mayor inestabilidad en la placa aterosclerótica y un incremento de su susceptibilidad a la ruptura.

Nuestro grupo también ha descrito la implicación de LRP1 en la aterotrombosis. La acumulación lipídica mediada por LRP1 induce la expresión y activación de factor tisular (TF) principalmente mediador de la coagulación sanguínea [114, 169, 170].

7. MIOCARDIO: CONTRACCIÓN Y METABOLISMO

7.1 CONTRACCIÓN CARDIACA

El calcio (Ca^{2+}) juega un papel importante en diferentes funciones fisiológicas de la célula, participando activamente en la contracción de la fibra muscular y en los sistemas de transporte de Ca^{2+} al interior celular. La concentración citoplasmática de Ca^{2+} es baja en la situación basal y aumenta de forma transitoria y regulada bajo ciertos estímulos. Si la homeostasis del Ca^{2+} no funciona correctamente, el Ca^{2+} se acumula en el citoplasma llegando a resultar tóxico. Cuando el miocardio se somete a reperfusión después de pequeños periodos de hipoxia el Ca^{2+} está directamente implicado en la muerte de los cardiomiocitos [171].

Durante la contracción cardiaca, la concentración intracelular de Ca^{2+} aumenta en el citoplasma activándose proteínas contráctiles. El mayor influjo de Ca^{2+} lo aportan los canales tipo-L [172, 173]. La entrada de Ca^{2+} a través de estos canales provoca que el RS, el mayor reservorio de Ca^{2+} intracelular en cardiomiocitos, libere más Ca^{2+} a través de los canales del receptor de *ryanodine* (RyR) [174].

En la fase de relajación cardiaca, los niveles de Ca^{2+} citoplásmico tienen que descender, por lo que un 20-30% es bombeado al exterior por la bomba de intercambio Na^+ - Ca^{2+} (NCX) [175] y el restante 70-80% es recaptado por el RS por la Ca^{2+} -ATPasa del SR (SERCA2) [174], mediante la regulación de *phospholamban* (PLN) [176]. Cuanto más Ca^{2+} secuestre el SR, mayor será la disponibilidad de Ca^{2+} para la siguiente contracción, por lo que SERCA2 es determinante en la velocidad y la amplitud de la contracción. La afinidad de SERCA2 por el Ca^{2+} es muy baja mientras PLN está desfosforilada. Sin embargo, cuando PLN se fosforila, SERCA2 es muy efectivo secuestrando Ca^{2+} y el RS se carga de Ca^{2+} [177] (Figura 15).

La contractibilidad cardiaca está controlada por el transporte de Ca^{2+} [178]. Las alteraciones en su homeostasis se deben a defectos en la expresión, función o regulación de proteínas implicadas en el manejo de este ión, y provocan disfunción sistólica y diastólica. SERCA2 es fundamental en el mantenimiento de la homeostasis del Ca^{2+} . Existen diversos estudios que demuestran los efectos deletéreos que tiene la reducción de SERCA2 en la función cardiaca [179, 180]. En particular, SERCA2 se encuentra fuertemente disminuida en el miocardio isquémico [181, 182]. La sobreexpresión de SERCA2 restaura la

contractibilidad cardiaca y reduce las arritmias en el miocardio isquémico [183-185]. El 40% de las bombas SERCA2 se regulan por PLN [186]. Se ha descrito que la expresión de SERCA2 también está modulada por el *Ca²⁺-dependent nonreceptor protein tyrosin kinase (PTK) proline-rich tyrosine kinase 2 (Pyk2)*, aunque existen controversias sobre si la modulación de SERCA2 por esta quinasa es positiva [187]o negativa [188].

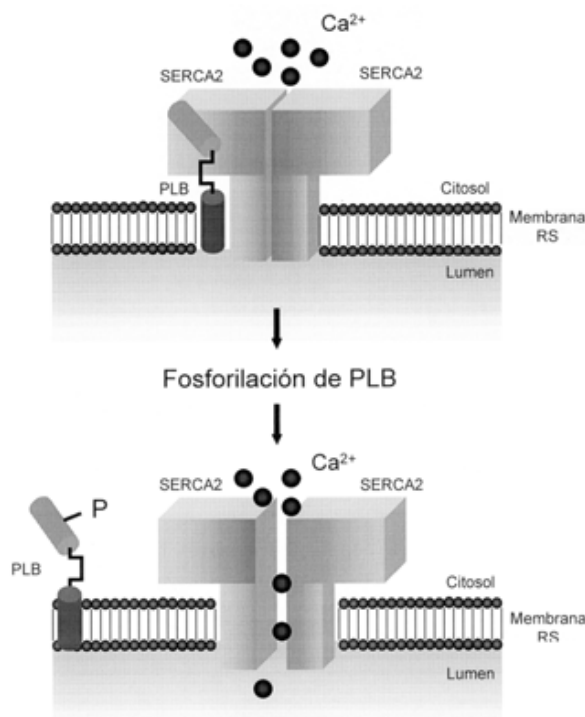


Figura 15. Modelo de acción de la PLN. La PLN desfosforilada inhibe la actividad de SERCA2 impidiendo el secuestro de Ca^{2+} en el interior del RS. La fosforilación de la PLN permite que SERCA2 se active y comience a recuperar Ca^{2+} para la siguiente contracción [177].

7.2 METABOLISMO LIPÍDICO CARDIACO

El músculo cardiaco es capaz de extraer del torrente sanguíneo el 80% del O_2 arterial, y de ahí, el 75% es empleado en la oxidación mitocondrial ya que el metabolismo del miocardio es esencialmente oxidativo [189]. El miocardio tiene la capacidad de extraer energía de distintas fuentes: carbohidratos (glucosa, lactosa, piruvato), AG libres, aminoácidos y cuerpos cetónicos, aunque los dos últimos son minoritarios como fuente de energía.

En condiciones de perfusión normal, el miocardio aeróbico obtiene la energía de la oxidación de los AG. El metabolismo de los AG inhibe el complejo piruvato-deshidrogenasa

clave en el metabolismo de la glucosa, priorizándose así el tipo de combustible. Sin embargo, en condiciones de isquemia, es más rentable el uso de glucosa como fuente energética debido a que requiere un menor consumo de oxígeno.

En el torrente sanguíneo, los AG pueden estar libres, asociados a albúmina, o formando parte de los TG que van en QM y VLDL. Los AG libres pueden difundir pasivamente al cardiomiocito o ser captados a través del receptor CD36 [190]. Se sabe que la deficiencia de CD36 está asociada a deficiencia de aporte de AG libres al miocardio [191]. La extracción de AG de los TG que van en los QM y VLDL requiere la participación de la LPL [192]. La LPL se encuentra presente en el lumen del endotelio, pero también aparece de forma activa en la superficie de los cardiomiocitos. Los ratones *ko* para LPL en el miocardio presentan disfunción cardíaca. Estos resultados demuestran que los AG libres no pueden compensar los AG que se generan mediante la actuación de LPL sobre las lipoproteínas, corroborándose la gran importancia de la LPL en el correcto aporte energético de AG al corazón [192].

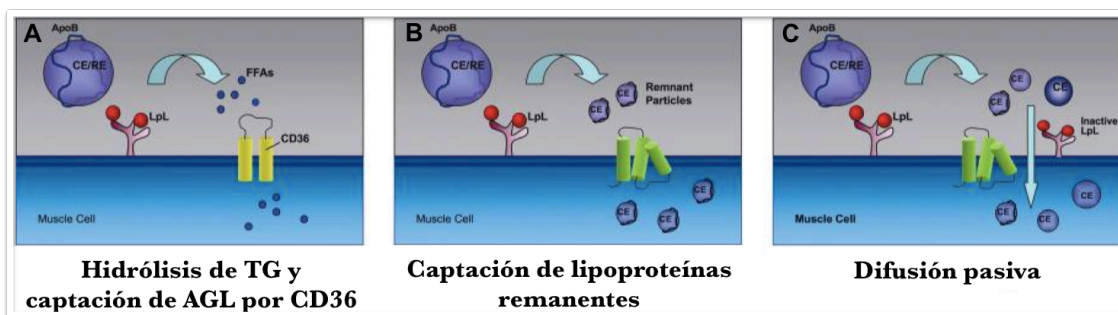


Figura 16. Captación de lípidos mediada por LPL. (A) LPL hidroliza lipoproteínas ricas en TG permitiendo que los AG libres (AGL) sean captados por el receptor CD36. (B) LPL produce lipoproteínas remanentes que interaccionan con receptores de membrana para la captación de lípido. (C) La lipólisis produce pequeñas partículas que difunden pasivamente al interior celular [192].

El miocardio también requiere colesterol para su correcto funcionamiento, siendo los QM y las VLDL las principales lipoproteínas que actúan como fuente de CE para el miocardio [193-195]. La LPL facilita la interacción de las VLDL con el VLDL-r [196]. Hay autores que muestran que la captación de CE de las VLDL por los cardiomiocitos requiere receptores lipoproteicos [194], mientras que otros autores sugieren que la entrada de CE al cardiomiocito se produce de forma independiente de receptores de las LDL [195].

8. HIPOXIA Y SUS EFECTOS CARDIOVASCULARES

La aterosclerosis y trombosis pueden originar una reducción total o parcial del flujo sanguíneo de las arterias coronarias, limitando la llegada de nutrientes y de oxígeno a la pared vascular y al tejido cardíaco. Como resultado, se produce daño tisular, alteraciones en el metabolismo celular y disfuncionalidad cardíaca.

A la íntima arterial el O_2 y los nutrientes llegan por difusión pasiva debido a que no posee irrigación. Durante el desarrollo de la lesión aterosclerótica aumenta el grosor de la íntima, por lo que disminuye el aporte de O_2 y nutrientes a las zonas más profundas de la íntima. La deficiencia de O_2 y otros factores esenciales transportados por la sangre provocan un estado de hipoxia en la pared del vaso [197, 198].

8.1 HIPOXIA

La hipoxia o disminución en el aporte de oxígeno inicia adaptaciones protectoras o patológicas en los tejidos ya que las células que los componen están normalmente preparadas para adaptar su metabolismo a la condiciones de oxígeno. La hipoxia promueve procesos fisiopatológicos que incluyen angiogénesis, inflamación y apoptosis, todos ellos implicados en la aterogénesis. Los niveles de oxígeno considerados hipóxicos dependen del órgano donde se produce la deficiencia pero generalmente la respuesta a la hipoxia se desencadena cuando la concentración de O_2 está por debajo de la presión venosa 40 mmHg, $\approx 6\% O_2$ [199].

Las células hipóxicas alteran la expresión de todo un conjunto de genes cuya expresión está regulada por el factor de transcripción inducible por la hipoxia (HIF, del inglés *hypoxia inducible factor*) [200]. HIF estimula genes cuyos promotores poseen elementos de respuesta a hipoxia o HRE (del inglés, *hypoxia responsive elements*), que median la restauración de la oxigenación e intentan limitar el daño causado por la falta de O_2 . Entre estos genes están la eritropoyetina (EPO) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que promueven la eritropoyesis y la angiogénesis respectivamente [201]. También en este grupo se encuentran genes que regulan el la función de los transportadores de glucosa y de hierro. La activación de estos genes permite la producción continua de energía en ambientes pobres en oxígeno [202].

La mayoría de las células son capaces de responder a variaciones en la concentración de oxígeno y muchas de esas respuestas celulares están controladas por HIF. Los factores de

transcripción HIF son heterodímeros compuestos por dos subunidades que se expresan de forma constitutiva: HIF-1 α (120 kDa) y HIF-1 β (94 kDa). La vida media de HIF-1 α en presencia de al menos un 5% de O₂ es inferior a 5 min, debido a que se hidroxila y se une al complejo ubiquitín ligasa E3, degradándose en el proteasoma. Sin embargo, el HIF-1 α se estabiliza en condiciones de hipoxia [203]. Por otro lado, la expresión de HIF-1 β no se modifica en presencia de O₂, pero es necesario para que se forme el heterodímero. En condiciones de hipoxia la subunidad HIF-1 α se trasloca al núcleo y forma el complejo HIF-1 $\alpha\beta$, el cual se une a los genes dianas en sus elementos HREs e incrementa la transcripción de genes implicados en la respuesta de adaptación a la hipoxia [203, 204].

8.2 MODIFICACIÓN DE LIPOPROTEÍNAS

La modificación de lipoproteínas por agregación y/o fusión se incrementa en situación presencia de condiciones hipóxicas [198].

En condiciones de hipoxia, las células cambian el metabolismo aeróbico por el anaeróbico. Gracias al metabolismo anaeróbico, la glucosa se convierte en lactato produciendo ATP [205]. En las zonas hipóxicas de la lesión aterosclerótica, normalmente las más profundas, se crea un ambiente ácido debido a la disminución del pH que causa la acumulación de lactato [205, 206]. En la zona más superficial, la subendotelial, el pH se mantiene cercano a la neutralidad. Por lo que dentro de la íntima se genera un gradiente de pH. De esta forma, cuando se produce la disfunción endotelial y las partículas lipoproteíca atraviesan el endotelio y llegan a la íntima, primero se encuentran un pH neutro y son modificadas por proteasas y lipasas activas a este pH. Conforme las lipoproteínas se van introduciendo en la pared vascular, el pH se va acidificando y modificándose por enzimas cuyo pH óptimo es ácido. De esta forma los distintos enzimas de la pared contribuyen a la retención de las lipoproteínas por los proteoglicanos de la íntima.

El resultado de la existencia de un ambiente ácido causado por la hipoxia es un incremento de la acumulación de lípidos modificados por agregación/fusión en la íntima arterial [198].

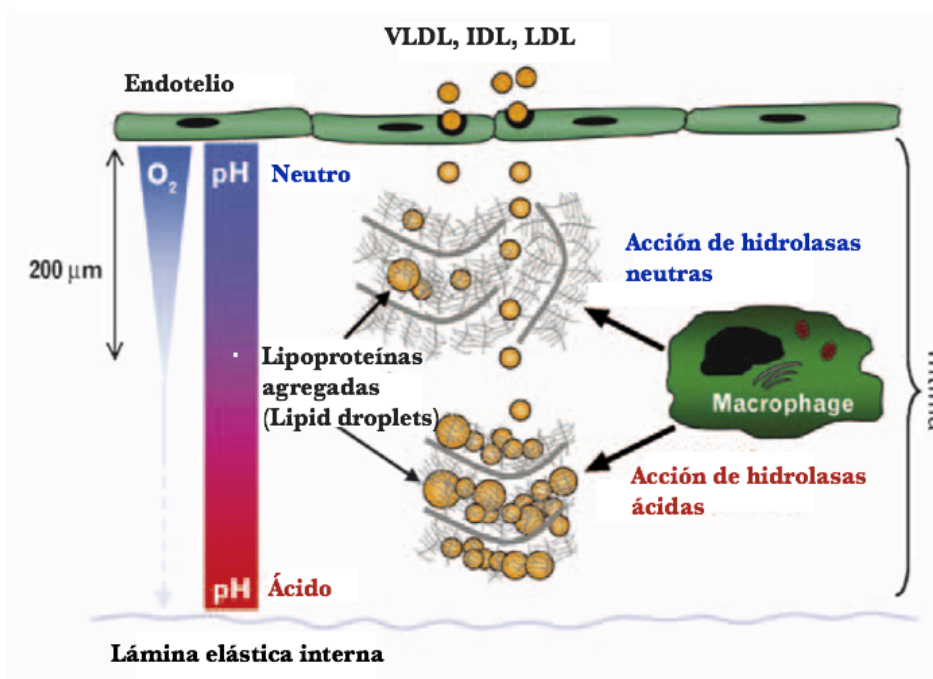


Figura 17. Acidificación del pH debido a la hipoxia. Los macrófagos secretan tanto hidrolasas que actúan a pH neutro como hidrolasas activas a pH ácido. En el ambiente neutro subendotelial las lipoproteínas son atacadas por hidrolasas que actúan óptimamente a pH neutro, mientras que en los ambientes profundos de la íntima, son atacadas por hidrolasas ácidas. A pH ácido la agregación y fusión de las lipoproteínas se incrementa [198].

8.3 HIPOXIA: REMODELADO VASCULAR Y CARDIACO

La estenosis progresiva en la lesión aterosclerótica de las arterias coronarias que irrigan el miocardio produce reducción de flujo sanguíneo y por tanto una disminución de la disponibilidad de O_2 y nutrientes tanto en la pared vascular como en el miocardio.

La situación de hipoxia que la deficiencia de O_2 produce en la pared del vaso y en el músculo cardíaco genera un remodelado vascular y cardíaco caracterizados por toda una serie de alteraciones, tanto estructurales como de función, que serán descritas en los siguientes apartados.

9. REMODELADO VASCULAR

La angiogénesis y el remodelado vascular son procesos que implican reclutamiento, migración, proliferación, interacción con la MEC y apoptosis de células vasculares [207]. Las VSMCs gobiernan el remodelado vascular a través de la modulación de la síntesis y degradación de los componentes de la MEC principalmente vía activación de MMPs y sus inhibidores (TIMPs). En condiciones fisiológicas normales, la actividad de las MMPs está regulada a distintos niveles: transcripción genética, zimógenos e interacción con inhibidores. Una pérdida del balance entre actividad de MMPs y TIMPs provoca la excesiva degradación de la MEC y ello induce migración/proliferación celular masiva, ruptura de la placa aterosclerótica y neovascularización, promoviendo la aterotrombosis [208]. La ruptura física de las placas ateroscleróticas, fuertemente correlacionada con la sobreexpresión y sobreactivación de MMPs [209, 210] es la responsable de las principales manifestaciones clínicas agudas de la aterosclerosis [84, 211].

9.1 METALOPROTEINASAS (MMPS)

Las MMPs, descubiertas en el año 1962 por Gross y Lapiere [212], son una familia de endopeptidasas que se expresan en diversos tipos celulares y que degradan componentes de la MEC. Hasta hoy se conocen al menos 24 miembros diferentes en la familia de las MMPs y todas ellas presentan un dominio catalítico que incluye un motivo de Zn^{2+} HEXXHXXGXXH característico [213]. Muchas de ellas se sintetizan como zimógenos inactivos, su dominio catalítico se encuentra unido a un dominio propeptídico que impide su actividad [214, 215]. Una vez activadas, ya sea *in vitro* por agentes químicos o *in vivo* por eliminación del dominio propeptídico, degradan o modifican moléculas activas residentes en la MEC.

Existen numerosos factores implicados en el remodelado vascular que regulan la expresión y la activación de las MMPs [207] (Figura 18). Cambios hemodinámicos como el aumento en la presión arterial transmural aumentan la activación de MMP-2 y MMP-9 en arterias carótidas porcinas [216]. Los excesos de ROS en VSMC inducen la expresión de MMP-2 en la pared vascular [217]. El TNF- α , mediador de la inflamación, induce la expresión y transcripción de MMP-9 en VSMCs de aorta de rata [218]. La hipoxia provoca un aumento en la expresión y actividad de MMP2 en células endoteliales [219].

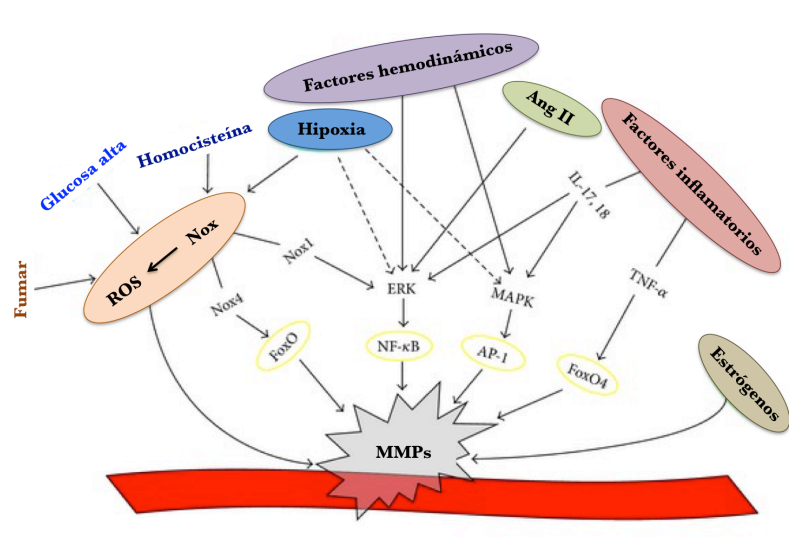


Figura 18. Estímulos principales implicados en el remodelado vascular. Modificado de Chen *et al.* [207].

Las gelatinasas MMP-2 y MMP-9, son las principales MMPs relacionadas con la formación de la neointima en modelos murinos [102, 103]. Los ratones apoE-*null ko* para MMP-2 y MMP-9 tienen menos acumulación de VSMCs en placas ateroscleróticas [220, 221]. La MMP-2 se expresa constitutivamente en VSMCs pero su sobreexpresión provoca la inducción de la sobreexpresión de la MMP-9 [215]. De hecho, las MMPs promueven o previenen la ruptura de la placa dependiendo del espectro de MMPs expresadas, su nivel de actividad y el estado de desarrollo de la placa [222]. Por un lado, la sobreexpresión de MMPs produce la degradación de la MEC y la reducción del contenido de colágeno de la placa. Al disminuir la capa fibrosa de la lesión aterosclerótica, las MMPs promueven la invasión de macrófagos y por ende el estado inflamatorio y angiogénico que favorece la ruptura de la placa aterosclerótica [222]. Por otro lado, las MMPs desprenden las VSMC de la membrana basal y promueven su migración. Al incrementar el grosor de la cubierta fibrosa favorecen la estabilidad de la placa [215, 223].

9.2 ATEROSCLEROSIS E HIPOXIA EN LA PARED VASCULAR

La hipoxia que se origina durante el desarrollo del proceso aterosclerótico promueve la progresión de la lesión [224], al alterar la estructura y la funcionalidad de la pared vascular. El conjunto de alteraciones inducen el remodelado vascular.

En las lesiones avanzadas existe una correlación positiva entre la presencia de hipoxia y el desarrollo de angiogénesis, proceso que intenta restaurar la oxigenación tisular sin conseguirlo, promoviendo en su lugar inestabilidad de la lesión [225]. Además, la exposición prolongada a hipoxia promueve la formación de células espumosas derivadas tanto de macrófagos como de VSMCs. Uno de los mecanismos que participa es el efecto potenciador de la hipoxia es la biosíntesis de TG y la reducción de la β -oxidación de los AG. Este proceso da lugar a un incremento en el número de vacuolas lipídicas citoplasmáticas ricas en TG. Jiang *et al* en 2007 demostraron el papel crítico de HIF-1 α en este proceso ya que la delección específica de HIF-1 α bloqueaba la formación de células espumosas [226].

A su vez la hipoxia participa en el engrosamiento de la pared arterial. La condición de hipoxia a través de HIF-1 α modula la proliferación y la migración de VSMCs desde la media hacia la íntima arterial, incrementando la cubierta fibrosa de la lesión aterosclerótica [227].

La hipoxia también modula el remodelado vascular mediante la regulación de Pyk2 [228, 229]. Pyk2 participa en diversos procesos biológicos que incluyen el crecimiento celular, la migración e invasión celular y la funcionalidad del citoesqueleto [228, 230]. Pyk2 promueve la proliferación de VSMCs de una forma PDGF dependiente, alterando el engrosamiento de la pared vascular [231] y participando activamente en la patogénesis de hipertensión pulmonar inducida por hipoxia [232]. Pyk2 regula la actividad de MMPs y por tanto la migración celular [233-235]. Koppel *et al* observaron que la capacidad de Pyk2 para promover la migración de queratinocitos se anulaba al bloquear la actividad catalítica de MMPs [233].

9.3 IMPLICACIÓN DEL LRP1 EN EL REMODELADO VASCULAR

Existen estudios que demuestran que la expresión y los niveles extracelulares de las MMPs se modulan por el receptor LRP1. Sin embargo, los resultados son controvertidos. Algunos autores han descrito que LRP1 es clave en la inducción de MMP-9 y MMP-2 y por tanto clave en la migración celular de células U87 de glioblastoma humano [236], de células Schwann en rata [237] y de VSMC en rata [238]. Sin embargo, otros autores han demostrado que la deficiencia de LRP1 causa una sobreexpresión de MMP-9 en macrófagos murinos [158].

INTRODUCCIÓN

Recientemente, nuestro grupo demostró que la expresión de LRP1 aumentaba en VSMCs humanas (hVSMCs) expuestas a hipoxia a través de HIF-1 α [162] y que la sobreexpresión del LRP1 inducía la formación de células espumosas a partir de hVSMCs [168]. La hipoxia incrementa la acumulación intracelular de CE en VSMCs *in vivo* [239] e *in vitro* [240].

10. REMODELADO CARDIACO

El remodelado cardíaco fue descrito por primera vez el año 1986 por el Dr. McKay [241] y se caracteriza por cambios en el tamaño, forma y funcionalidad del miocardio. Estos cambios son el resultado de una respuesta progresiva del corazón a daños tanto agudos como crónicos, aunque la causa más común del remodelado cardíaco es el infarto agudo de miocardio.

10.1 IMPACTO DE LA DISLIPIDEMIA EN EL REMODELADO CARDIACO

10.1.1 Alteraciones en composición y estructura del miocardio hipercolesterolemico

La dislipemia tiene un impacto directo en el remodelado cardíaco alterando la estructura y la composición de la MEC. Uno de los principales componentes de la MEC es la elastina, la cual conforma una red proteica tridimensional que puede ser eficientemente degradada por cisteín proteasas o catepsinas. En situación de dislipemia, la elastina vascular es degradada [242-244].

En el año 2012 nuestro grupo describió que la acumulación de CE en hVSMCs provoca alteraciones en las características físicas de la tropoelastina (TE), el precursor soluble de la elastina [115]. La red que forma la elastina en la MEC tiene una arquitectura muy particular que determina las propiedades elásticas de la MEC y la insolubilidad y resistencia a la proteólisis [245]. La fragmentación de esta red puede causar ruptura de la placa aterosclerótica e infarto de miocardio en un modelo experimental murino de aterosclerosis [246].

10.1.1.1 Catpesinas y remodelado

Las catepsinas (Cats) son un grupo de proteasas, principalmente endopeptidasas que pueden ser serín Cats (Cat A-G), aspartato Cats (Cat D y E) o cisteín Cats [247]. Las cisteín Cats se sintetizan como pro-enzimas inactivas en el RS, se glicolisan en el aparato de Golgi y se terminan activando en los lisosomas, autocatalíticamente [248] o por la acción de otras enzimas [249].

Las cisteín Cats poseen una alta capacidad de degradar proteínas de la MEC. Las alteraciones en la función de las cisteín Cats se relacionan con remodelado cardiaco debido a que promueven la degradación de la MEC, apoptosis y angiogénesis [250]. El remodelado está asociado con cardiomiopatía dilatada [251], isquémica [252] e hipertensiva [253]. Las Cat K, Cat L y Cat S juegan un papel clave en la degradación de la MEC cardiaca [247, 254] ya que degradan fibras de colágeno tipo I y II [255], elastina [256] y perlecán [257]. Los niveles de Cat S están muy aumentados en placas ateroscleróticas [247]. En nuestro grupo demostramos que hVSMCs con alto contenido intracelular de lípido expresaban altos niveles de Cat S. Por tanto, las hVSMCs expuestas a lipoproteínas modificadas pueden contribuir a la fragmentación de la elastina [115].

10.1.2 Alteraciones en función cardiaca

En condiciones normales, los lípidos se acumulan en el tejido adiposo y se utilizan como fuente de energía. Sin embargo, hay situaciones en las que los lípidos neutros (CE y TG) se acumulan en otros tejidos no adiposos produciendo efectos deletéreos. La esteatosis (acumulación en tejido no adiposo) puede ocurrir en la pared vascular, el músculo esquelético, el hígado, el páncreas y el corazón. Algunos de estos tejidos tienen mecanismos compensatorios para soportar la carga de lípido. Sin embargo, otros como el páncreas [258] y el corazón [259, 260], son muy vulnerables a la sobreacumulación de lípidos, produciéndose graves alteraciones funcionales.

La acumulación de lípido en el corazón contribuye a la patogénesis del fallo cardiaco por los efectos lipotóxicos de los metabolitos lipídicos [261]. La esteatosis cardiaca está presente en condiciones fisiopatológicas tales como la diabetes [262], la obesidad [263] y la isquemia cardiaca [264].

En particular, la acumulación de AG en el miocardio, produce disfunción cardiaca [260], apoptosis de miocitos [265], disfunción mitocondrial [266] y alteraciones del RS [267]. Esta lipotoxicidad está causada por una gran variedad de moléculas que incluye especies reactivas de oxígeno (ROS), NO, ceramida, leptina, otras adipoquinas, PI3K... [268]. La sobreacumulación de TG provoca una hiperactivación de la β -oxidación de los AG en la mitocondria, que conlleva a una excesiva formación de ROS y alteraciones en la modulación de SERCA2. Las deficiencias en la regulación SERCA2 se asocian con disfunción sistólica y diastólica y mal funcionamiento de la contracción cardiaca [268, 269].

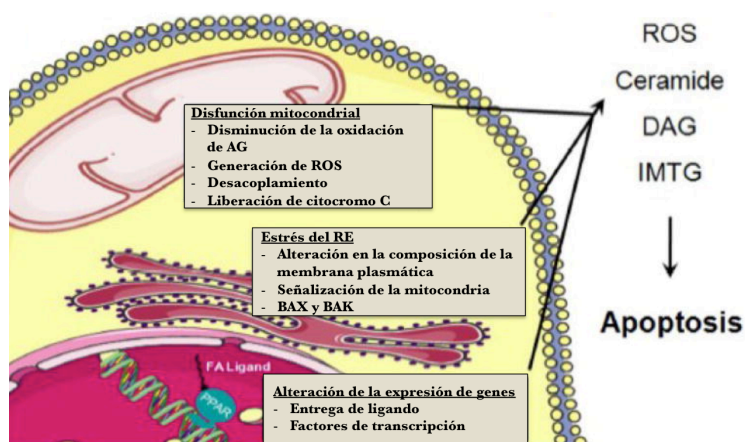


Figura 19. Mecanismos de lipotoxicidad. [268]

La hipercolesterolemia también está relacionada con fenómenos de lipotoxicidad cardíaca. La sobreacumulación de CE en el corazón reduce la expresión y activación de SERCA2 [270, 271], reduce RyR y aumenta NCX [272], produciéndose serias alteraciones en la contractibilidad cardíaca.

10.2 IMPACTO DE LA ISQUEMIA MIOCÁRDICA EN EL REMODELADO CARDIACO

10.2.1 Alteraciones en el manejo del calcio y en la función contráctil del miocardio isquémico

Las bajas concentraciones de O_2 provocan un incremento del Ca^{2+} intracelular debido a un aumento de los canales de Ca^{2+} tipo L y a una mayor liberación de Ca^{2+} desde el RS [273]. Estos cambios se producen por las alteraciones en la fosforilación de PLN y en la estabilización de RyR en el miocardio isquémico [274]. El aumento de Ca^{2+} en los cardiomiocitos es clave para muerte celular, las arritmias y la disfunción contráctil en situación de isquemia aguda [275]. La hipoxia además provoca disfunción mitocondrial [276], lo que contribuye a la generación de ROS [277] y finalmente a la apoptosis y necrosis de los cardiomiocitos [277, 278].

Existen estudios en modelos animales así como estudios clínicos que describen la supresión de SERCA2 como causa de disfunción cardíaca [179, 180, 279]. En particular, la reducción de SERCA2 es un parámetro importante en el miocardio isquémico [181, 182]. El incremento de los niveles de ROS parece ser una de las causas

de la reducción de SERCA2 en situación de isquemia [280]. También se ha descrito como la activación de HIF-1 α por la hipoxia regula negativamente el promotor de SERCA2 [281]. Modelos murinos *ko* heterocigotos para HIF-1 $\alpha^{+/-}$ con isquemia cardíaca transitoria muestran una mayor predisposición en presentar alteraciones en la contractibilidad cardíaca [282].

10.2.2 Alteraciones en composición y estructura en el miocardio isquémico

La hipoxia produce también alteraciones en la estructura y composición de la MEC del miocardio. La MEC cardíaca incluye colágenos, glicoproteínas, proteoglicanos y glucosaminoglicanos, y su degradación contribuye al remodelado cardíaco [283].

En el corazón isquémico tras un infarto de miocardio se produce pérdida de miocitos, hipertrofia y aumento del número y del tamaño de células que no son miocitos [284-286]. El primer evento causado por la isquemia es la degradación de la MEC, lo que permite la llegada de células inflamatorias y factores necesarios para la formación de la cicatriz en la zona infartada. La pérdida de colágeno en la MEC va asociada a un incremento en la actividad de las proteasas [287].

Se ha demostrado que los ratones deficientes para MMP-9 y MMP-2 tienen menor infiltración de macrófagos y menor remodelado cardíaco en la zona isquémica [288, 289]. Estos datos demuestran la importancia de estas MMPs en el remodelado cardíaco adverso.

10.2.3 Acumulación lipídica en el miocardio isquémico

Se ha descrito la presencia de lípidos en la zona peri-infarto del corazón en diferentes modelos animales de isquemia miocárdica [202] y el lípido acumulado se ha asociado a mecanismos de lipotoxicidad [264].

En pacientes con infarto crónico de miocardio se encontró una prevalencia de acumulación de lípidos del 68% en las zonas cercanas al infarto. Los pacientes con deposición miocárdica de lípidos poseían una mayor zona de infarto y una funcionalidad cardíaca alterada. Esto es debido a que el lípido miocárdico se correlaciona inversamente

con la fracción de eyección y directamente con la masa de ventrículo izquierdo, remodelado cardiaco que empeora la funcionalidad del corazón [290].

Se asume que los lípidos que se acumulan en el miocardio son TG. La sobreacumulación de TG en el miocardio isquémico podría explicarse por el cambio de metabolismo aeróbico a anaeróbico, lo que comporta que la obtención de energía no se produce mediante la β -oxidación de AG sino por la glucólisis [202]. Además, también se ha descrito que la actividad de la LPL [291] y la del receptor CD36 [292] están incrementadas durante la isquemia participando en el aporte de AG al miocardio isquémico.

Las vacuolas lipídicas formadas por un exceso de AG libres podrían proteger contra la apoptosis celular al canalizar el exceso de AG a la creación de reservas de TG [293] y al secuestrar el exceso de Ca^{2+} intracelular [294]. Sin embargo, el exceso en la acumulación de TG también produce daños en la funcionalidad del miocardio [262].

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Nuestro grupo ha demostrado previamente que la expresión del LRP1 está incrementada por factores de riesgo cardiovascular tales como la hipertensión [161] y la hipercolesterolemia en hVSMCs [160]. En hVSMCs [153] y macrófagos [105], uno de los ligandos del LRP1 son las LDLag. Las LDLag *in vitro* [160] y la hipercolesterolemia *in vivo* [159] aumentan la expresión de LRP1 en hVSMCs y lesiones ateroscleróticas, respectivamente. El incremento del LRP1 en hVSMCs produce un aumento de la captación de LDLag y la consecuente acumulación intracelular de CE, proceso que conduce a la transformación de las hVSMCs en células espumosas [168]. Nuestro grupo también ha demostrado que la hipoxia, a través del factor inducible de hipoxia (HIF)-1 α , incrementa la expresión del LRP1, en hVSMCs [162] y cardiomiocitos [163, 295]. El aumento de LRP1 inducido por hipoxia incrementa la captación y acumulación intracelular de colesterol esterificado en hVSMCs y cardiomiocitos expuestos a lipoproteínas aterogénicas LDLag [162] y VLDL [163, 295]. Además, nuestro grupo ha demostrado que los niveles de LRP1 en el miocardio se correlacionan positivamente con la acumulación miocárdica de CE en pacientes con cardiomiopatía isquémica [295].

Nuestros estudios reflejan un papel fisiopatológico de la sobreexpresión del receptor LRP1 en las células musculares lisas vasculares y en los cardiomiocitos por promover la acumulación de colesterol esterificado en pared vascular y miocardio.

La dislipemia tiene un impacto directo en el remodelado vascular y cardiaco, alterando componentes de la MEC como la elastina. Previamente hemos demostrado que las hVSMCs con un alto contenido lipídico intracelular producen niveles más elevados de CatS, proteasa con alta capacidad de degradar componentes de la MEC, principalmente la elastina [115]. A pesar de la gran relevancia de la elastina en el remodelado vascular y cardiaco, se desconoce el efecto de la acumulación lipídica en los cardiomiocitos sobre las características de la tropoelastina (TE). Por ello, nos planteamos investigar los efectos de la acumulación intracelular de lípidos neutros en los cardiomiocitos sobre las características estructurales y físicas de la TE y descubrir el papel que juegan el LRP1 y la CatS en dichos efectos.

La hipoxia es un factor que altera la función vascular promoviendo el remodelado de la MEC, cuya integridad y composición está modulada por MMPs. La expresión [296] y los niveles extracelulares [297] de MMP-9 pueden estar regulados por el LRP1, aunque hoy en día las consecuencias de la alteración de la expresión del LRP1 en la expresión y actividad de la MMP-9 son controvertidas. A su vez, se sabe que la hipoxia altera la fosforilación de Pyk2 [229], quinasa que participa en diversos procesos biológicos como crecimiento celular, diferenciación, metabolismo y función de citoesqueleto [228]. En este trabajo nos

propusimos estudiar el efecto de la hipoxia en expresión y activación de MMPs y determinar el papel del LRP1 y Pyk2 en la modulación de MMPs por hipoxia.

La isquemia cardiaca reduce drásticamente los niveles de la bomba de Ca^{2+} ATPase del retículo sarcoplásmico (SERCA2), crucial para la función cardiaca. Estudios en nuestro grupo han mostrado que la hipoxia incrementa la fosforilación de Pyk2 de forma dependiente a la expresión de LRP1 [298], pero existen datos controvertidos sobre la participación de Pyk2 en la modulación de SERCA2 [187, 188]. Es por ello que en nuestro grupo nos planteamos estudiar el papel del LRP1 y sus vías de señalización en la disminución de SERCA2 en cardiomiocitos expuestos a hipoxia.

OBJETIVO GENERAL

El objetivo de este trabajo fue estudiar la implicación del receptor LRP1 en el remodelado vascular y cardiaco asociado a factores de riesgo como la hiperlipemia y condiciones fisiopatológicas como la hipoxia, tanto en hVSMCs como en cardiomiocitos HL-1, así como elucidar los mecanismos de señalización dependientes de LRP1 involucrados en el remodelado vascular y cardiaco.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Objetivo 1. Investigar el papel del LRP1 y las vías de señalización dependientes de LRP1 involucradas en la activación de MMP-9/MMP-2 y en la migración de hVSMCs en condiciones de hipoxia.

Objetivo 2. Analizar el efecto de la acumulación intracelular de CE sobre las características de la TE e investigar el papel del LRP1 y CatS sobre estos efectos en cardiomiocitos HL-1.

Objetivo 3. Estudiar el papel del LRP1 en la modulación de los niveles de SERCA2 por hipoxia en cardiomiocitos HL-1 y establecer los mecanismos de señalización dependientes de LRP1 que participan.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. CULTIVOS CELULARES

1.1 Células musculares lisas vasculares humanas

El protocolo de obtención de células musculares lisas vasculares humanas (hVSMC, del inglés *human vascular smooth muscle cells*) fue aprobado por el Comité Ético de Investigación del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona de acuerdo con la Declaración de Helsinki. Las células musculares se obtuvieron de arterias coronarias humanas procedentes de corazones extraídos a pacientes sometidos a trasplante cardiaco en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, siguiendo la técnica de explantes descrita por nuestro grupo [153, 160, 299].

Las coronarias se limpiaron, se abrieron longitudinalmente y se rasparon suavemente para eliminar la capa de células endoteliales. Se separó la capa media de la adventicia y se cortó en fragmentos de 1mm x 1mm. Los explantes de túnica media se incubaron a 37°C con 5% de CO₂. Tras una semana, las células comenzaron a migrar desde el explante y a crecer cubriendo toda la placa de cultivo. Las células empleadas en los experimentos estaban entre el cuarto y séptimo pasaje y se cultivaron en medio 199 (Gibco®, ref. 22340-087) suplementado con suero bovino fetal (SBF) (Invitrogen™, ref. 04-001-1A), suero humano (procedente de pacientes del Hospital Vall d'Hebrón), penicilina-estreptomicina (Sigma-Aldrich Co, ref. 15140-122) y L-Glutamina (Sigma-Aldrich Co, ref. 25030-024) (tabla 1 m&m), y mantenidas a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂.

MEDIO COMPLETO	MEDIO DE QUIESCENCIA	MEDIO DE TRATAMIENTO
Medio 199	Medio 199	Medio 199
20% SBF	0.2% SBF/día	0% SBF
2% suero humano	0% suero humano	0% suero humano
L-Glutamina 2mmol/L	L-Glutamina 2mmol/L	L-Glutamina 2mmol/L
Penicilina G 100U/mL	Penicilina G 100U/mL	Penicilina G 100U/mL
Estreptomicina 100µg/mL	Estreptomicina 100µg/mL	Estreptomicina 100µg/mL

Tabla 1 m&m. Composición de los medios de cultivo de hVSMC

1.2 Células musculares lisas vasculares murinas

El cuidado de los animales se realizó en concordancia con las guías y regulaciones institucionales, y los procedimientos animales fueron aprobados por el Comité Ético de Investigación del Instituto Catalán de Ciencias Cardiovasculares (ICCC). Las células

musculares lisas vasculares de ratón (mVSMC, del inglés *mouse vascular smooth muscle cells*) se obtuvieron de aorta de ratones C57BL/6 mediante la técnica de explantes [300]. Las células empleadas en los experimentos estaban entre el cuarto y séptimo pasaje, se crecieron en medio DMEM (Gibco®, ref. 42430-082) suplementado con SBF, penicilina-estreptomicina y L-Glutamina (Tabla 2 m&m), y fueron mantenidas a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂.

MEDIO COMPLETO	MEDIO DE QUIESCENCIA	MEDIO DE TRATAMIENTO
Medio DMEM	Medio DMEM	Medio DMEM
10% SBF	0.2% SBF/día	0% SBF
L-Glutamina 2mmol/L	L-Glutamina 2mmol/L	L-Glutamina 2mmol/L
Penicilina G 100U/mL	Penicilina G 100U/mL	Penicilina G 100U/mL
Estreptomicina 100µg/mL	Estreptomicina 100µg/mL	Estreptomicina 100µg/mL

Tabla 2 m&m. Composición de los medios de cultivo de mVSMC.

1.3 Cardiomiocitos HL-1

La línea celular murina de cardiomiocitos atriales HL-1 fue generada por el Dr. W.C. Claycomb (Louisiana State University Medical Centre, New Orleans, Louisiana, USA) y amablemente facilitada por el Dr. U Rauch (Charité-Universitätmedizin Berzlin). Estas células son capaces de contraerse y conservan características fenotípicas de cardiomiocitos adultos, tanto morfológicas como bioquímicas y electrofisiológicas [301].

Los cardiomiocitos HL-1 se cultivaron en placas gelatinizadas con 12,5µg/mL de fibronectina de plasma bovino 0.1% (Sigma-Aldrich Co, ref. F1141) y 0,02% de Difco™ gelatina (BD Bioscience, ref. 214340), y se mantuvieron en medio Claycomb (Sigma-Aldrich Co, ref. 51800C) suplementado con SBF, penicilina-estreptomicina, L-Glutamina y Norepinefrina (+) (Sigma-Aldrich Co, ref. A0937) (Tabla 3 m&m), a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂.

MEDIO COMPLETO	MEDIO DE QUIESCENCIA	MEDIO DE TRATAMIENTO
Medio Claycomb	Medio Claycomb	Medio Claycomb
10% SBF	0.2% SBF/día	0% SBF
L-Glutamina 2mmol/L	L-Glutamina 2mmol/L	L-Glutamina 2mmol/L
Norepinefrina 100µM	Norepinefrina 100µM	Norepinefrina 100µM
Penicilina G 100U/mL	Penicilina G 100U/mL	Penicilina G 100U/mL
Estreptomicina 100µg/mL	Estreptomicina 100µg/mL	Estreptomicina 100µg/mL

Tabla 3 m&m. Composición de los medios de cultivo de cardiomiocitos HL-1.

Nuestro grupo desarrolló una línea de HL-1 deficiente para el LRP1 de forma estable mediante trasfección de la línea celular de cardiomiocitos HL-1 con lentivirus. La suplementación del medio de cultivo con blasticidina (10µg/mL, Invitrogen™, ref.A11139-03) permitió el crecimiento selectivo de las HL-1 deficientes en LRP1 [163].

1.4 Macrófagos derivados de monocitos humanos (MDMH)

Los MDMH se aislaron a partir de residuos leucocitarios de donantes sanos mediante un protocolo estándar aprobado por el Comité Ético de Investigación del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, en acuerdo con la Declaración de Helsinki. Se aplicaron 15 mL de Ficoll-Hypaque (GE Healthcare, ref. 17-1440-03) al tubo de sangre y se centrifugaron a 400 xg durante 40 min a temperatura ambiente (TA). Las células mononucleares se obtuvieron de la parte blanca central del gradiente y se lavaron exhaustivamente en PBS1x (2.7 mM KCl, 0.137 M NaCl, 1.5 mM KH₂PO₄) antes de ser resuspendidas en medio RPMI 1640 Glutamax (Gibco® ref. 61870-010), suplementado con suero humano AB (Lonza, ref. 14-490E), penicilina-estreptomocina y HEPES 1M (Gibco® ref. 15630-056) (tabla 4 m&m). Las células se diferenciaron a macrófagos mediante la exposición a suero humano al 10% durante 7 días cambiando el medio de cultivo diariamente.

MEDIO COMPLETO	MEDIO DE QUIESCENCIA	MEDIO DE TRATAMIENTO
Medio RPMI	Medio RPMI	Medio RPMI
10% suero AB	0.2% suero AB	0% suero AB
1% HEPES	1% HEPES	1% HEPES
Penicilina G 100U/mL	Penicilina G 100U/mL	Penicilina G 100U/mL
Estreptomocina 100µg/mL	Estreptomocina 100µg/mL	Estreptomocina 100µg/mL

Tabla 4m&m. Composición de los medios de cultivo de MDMH.

1.5 Tratamientos celulares

Los tratamientos en condiciones de normoxia (21% de O₂) se llevaron a cabo en un incubador Nirco con un ambiente 74% N₂ y 5% CO₂, y los tratamientos en condiciones de hipoxia en un incubador Anoxic Workstation H35 de Don Whitley Scientific Ltd. con una mezcla de gases de 1% O₂, 94% N₂ y 5% CO₂.

Para exponer los cultivos celulares a lipoproteínas, se utilizaron lipoproteínas que no tenían más de 24h y no poseían niveles detectables de endotoxina (Limulus Amebocyte

Lysate test, Bio Whittaker). Los tratamientos se realizaron a una concentración de 100 µg/mL [160].

2. MODELOS ANIMALES

Ratas macho Zucker diabéticas y obesas (ZDF) y ZDFc (controles) de 7 semanas de edad procedentes de Charles River Laboratories (L'Arbresle Cedex, France) fueron mantenidas en concordancia con las guías y regulaciones institucionales, y los procedimientos animales fueron aprobados por el Comité Ético de Investigación.

El corazón de estos animales fue extraído e inmediatamente congelado a -80°C. Diferentes alícuotas de tejido homogeneizado fueron empleadas para análisis lipídicos, moleculares y físicos.

3. TEJIDO MIOCÁRDICO HUMANO

Se recolectaron un total de 6 corazones humanos procedentes de pacientes con cardiomiopatía isquémica sometidos a trasplante de miocardio en el Hospital de Santa Creu i Sant Pau de Barcelona. Se dispuso de los datos clínicos, electrocardiogramas, estudios hemodinámicos y angiografías de coronaria de todos los pacientes. Los sujetos fueron clasificados de acuerdo con los criterios de la *New York Heart Association* (NYHA) y recibieron el tratamiento médico de acuerdo con las guías de la *European Society of Cardiology*.

Se emplearon también 4 corazones sanos como controles. Estos corazones procedieron de donantes fallecidos en accidente de tráfico y que no podían considerarse para trasplante cardíaco por incompatibilidad en el tamaño del órgano o por el tipo sanguíneo. Todos los donantes tenían una función ventricular izquierda normal, ausencia de enfermedad cardíaca en su historial y ausencia de infecciones activas. Las muestras de miocardio se mantuvieron a -80°C hasta su procesamiento.

El proyecto fue aprobado por el Comité Ético del Hospital de Sant Pau, Barcelona y estaba en concordancia con las guías de la Declaración de Helsinki. El tejido ventricular congelado fue pulverizado usando un mortero en nitrógeno líquido y las muestras homogeneizadas se utilizaron para la extracción de RNA y proteína total mediante

Tripure™ *isolation reagent* (Roche Diagnostics GmbH, ref. 11 667 165 001) según el protocolo del fabricante.

4. LIPOPROTEÍNAS

4.1 Aislamiento y caracterización de lipoproteínas humanas

4.1.1 Aislamiento de lipoproteínas

Las lipoproteínas humanas se obtuvieron de una mezcla de sueros nomolipémicos de donantes del Banco de Sangre y Tejidos de Barcelona. Los sueros con concentraciones superiores a 5.2 mmol/L y 1 mmol/L para colesterol total y triglicéridos respectivamente fueron desechados. Las diferentes fracciones de lipoproteínas tienen distintas densidades (tabla 5 m&m) y su aislamiento se basa en la separación en función de la diferencia de densidad mediante ultracentrifugaciones secuenciales [302].

LIPOPROTEÍNAS	DENSIDAD
QM	< 0.96 g/mL
VLDL	0.96-1.006 g/mL
IDL	1.006-1.019 g/mL
LDL	1.019-1.063 g/mL
HDL	1.063-1.210 g/mL

Tabla 5 m&m. Clasificación de las lipoproteínas según su densidad. QM: quilomicrones. VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad. IDL: lipoproteínas de densidad intermedia (en la centrifugación secuencial se separan juntas VLDL+IDL). LDL: lipoproteínas de baja densidad. HDL: lipoproteínas de alta densidad.

En los tratamientos celulares se emplearon VLDL y LDL. Para su aislamiento primero se preparó una solución madre de densidad 1,006 g/mL en H₂O destilada, pH 7.4 (tabla 6 m&m).

SOLUCION DE DENSIDAD 1.006 g/mL
Cloranfenicol 15.5 mM
NaCl 0.2 M
EDTA tetrasodio 1mM
EDTA disodio 0.8 mM
Sulfato de Gentamicina 0.1 mM
Azida de sodio 8 mM

Tabla 6 m&m. Composición de la solución de densidad 1.006 g/mL

Aislamiento de VLDL e IDL. Primeramente, el suero se centrifugó a 36000 rpm a 4°C durante 30 min para descartar la fase superior de QM. A continuación se añadió KBr al suero para llevar la densidad a 1.019 g/mL y se repartió en tubos de ultracentrífuga. Encima del suero se añadió lentamente la solución de densidad 1.019 g/mL, preparada añadiendo KBr a la solución madre de densidad 1.006 g/mL, para formar una fase superior con la solución de densidad y otra fase inferior con el suero. Tras una centrifugación a 36000 rpm a 4°C durante 18 h se aisló la fase superior blanca formada por VLDL e IDL. La fase con las VLDL-IDL se guardó a 4°C protegida de la luz.

Aislamiento de LDL. Después de retirar las VLDL e IDL, se eliminó la solución de densidad 1.019 g/mL de la parte superior de los tubos y se volvieron a mezclar los sueros de todos los tubos. Se añadió otra vez KBr para llevar su densidad a 1.063 g/mL, y se repartió en los tubos de ultracentrífuga. Se añadió encima del suero la solución de densidad 1.063 g/mL, preparada añadiendo KBr a la solución madre de densidad 1.006 g/mL, para formar una fase superior con la solución de densidad y otra inferior con el suero. Tras una centrifugación a 36000 rpm a 4°C durante 18 h se aisló la fase superior que contenía las LDL. La fase con las LDL se guardó a 4°C protegida de la luz.

Una vez aisladas las diferentes fracciones lipoprotéicas, se dializaron en tampón de diálisis 1x (tabla 7 m&m) durante 20 horas (2 horas de diálisis, renovación del tampón y 18 horas más de diálisis) y 2 h en NaCl (0.15M).

TAMPÓN DE DIALISIS 10x
NaCl 1.5 M
Trizma Base 0.2 M
EDTA disodio 10 mM

Tabla 7 m&m. Composición del tampón de diálisis 10x para el aislamiento de lipoproteínas humanas.

4.1.2 Caracterización de las lipoproteínas

La caracterización de las lipoproteínas se llevó a cabo analizando varios parámetros: concentración, cuantificación y grados de oxidación y movilidad.

La determinación de la **concentración proteica** se realizó utilizando el método del ácido bicinonínico (BCA), basado en el método de Lowry [303]. Las muestras diluidas y una recta patrón de albúmina bovina (BSA) (kit de Pierce, ref. 23225) se incubaron 30 min a

60°C para romper la estructura lipoproteica y permitir que el BCA pudiese reaccionar con determinados aminoácidos y producir un compuesto coloreado que absorbe a 562 nm.

Para la **cuantificación de colesterol** se empleó un kit comercial (kit RefLab.Brand, ref. 139-204) basado en el método de Allain [304]. Se utilizó un estándar de colesterol para la cuantificación de las muestras que se midieron a 510 nm.

El **análisis del grado de oxidación** de las lipoproteínas se analizó determinando los niveles de malondialdehído (MDA) mediante el ensayo TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances, Janssen Chimica), cuyo análisis indirecto determina la concentración de sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBA). El MDA, producto secundario de la autooxidación de los ácidos grasos con tres o más dobles enlaces, sufre una reacción con el TBA y produce un cromóforo rosado que se detecta a 532 nm. Se consideró que las muestras no están oxidadas cuando los valores de TBARS estuvieron por debajo de 1.2 nmol MDA/mg de proteína de LDL.

La caracterización **movilidad electroforética** se realizó con un gel comercial 0.5% agarosa (Paragon Lipoprotein Electrophoresis kit, Beckman Coulter) y tinción con negro sudán de las diferentes fracciones de lipoproteínas. Las lipoproteínas se separaron según su carga y masa comprobando así el correcto aislamiento de las VLDL y las LDL.

4.2 Modificación de las LDL por agregación

La modificación por agregación de las LDL se realizó de forma mecánica [305]. Para obtener las LDL agregadas (LDLag) se diluyeron las LDL nativas (LDLn) con PBS1x hasta una concentración final de 1.5 mg/mL. Una vez diluidas se agitaron intensamente en un agitador *vortex* durante 4 min a TA, tras lo cual se centrifugaron a 10000 xg durante 10 min a TA para precipitar las LDLag. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron en PBS1x hasta una concentración proteica de 1 mg/mL. La agregación mecánica es similar a la obtenida por incubación con proteoglicano versicán de matriz extracelular[58].

4.3 Acumulación lipídica intracelular

Se realizaron cromatografías en capa fina (CCF) a partir de extractos lipídicos celulares para el estudio de la acumulación intracelular de colesterol libre (FC), colesterol esterificado (CE) y triglicéridos (TG) derivados de las lipoproteínas LDLn, LDLag y VLDL.

4.3.1 Extracción lipídica

Para recoger las células se lavaron exhaustivamente en la placa de cultivo mediante: PBS1x, PBS1x + BSA 1%, PBS1x + BSA 1% + Heparina 100 U/mL, PBS 1x + BSA 1% y PBS 1x, con el objetivo de eliminar las lipoproteínas adheridas al exterior de las membranas plasmáticas y que no habían sido captadas por las células. Tras ello, se adicionó 1 mL de NaOH 0.1 N para lisar las células. El contenido lipoproteico de los extractos se cuantificó para normalizar por cantidad de proteína.

El protocolo de extracción lipídica empleado es una modificación del método descrito por Bligh [306]. Se mezclaron entre 600-800 μ L de extracto celular con 400-200 μ L de H₂O y se añadieron 3mL de una mezcla 1:2 de diclorometano:metanol en tubos de vidrio de fondo redondo previamente lavados con diclorometano. Tras una agitación mediante agitador *vortex*, se añadió 1 mL de diclorometano y se agitó unos 10s. Se realizó una centrifugación a 3500 rpm durante 15 min a TA y se obtuvo una fase superior acuosa separada de la fase inferior orgánica (con el contenido lipídico intracelular) por una fase intermedia proteica. La fase orgánica se recogió en un tubo de vidrio de fondo cónico. Se repitió el proceso con la fase acuosa añadiendo 1 mL de diclorometano, agitando y centrifugando otra vez a 3500 rpm 15 min a TA. Se juntaron las fases orgánicas y se concentraron evaporando el solvente orgánico bajo una corriente de N₂ para evitar la oxidación de los lípidos.

4.3.2 Cromatografía en capa fina (CCF)

Las muestras concentradas se resuspendieron en 100 μ L de diclorometano, se agitaron en un *vortex* y se cargaron en una placa de sílica de cromatografía (DC-Fertigplatten SIL G-25 UV, Macherey-Nagel, ref. 809023). En cada placa se cargaron además estándares de FC, CE y TG con una concentración conocida para poder cuantificar las muestras.

Se corrieron dos fases móviles diferentes. La primera fase compuesta por una mezcla de heptano:dietil-éter:ácido acético (72:21:4) separó los diferentes lípidos. La segunda fase formada por heptano arrastró los lípidos que no interesaban con el frente y se dejó correr 4 cm más que la fase anterior. Una vez seca, la placa se tiñó durante 1 min con una solución al 5% de ácido fosfomolibdico y al 5% de ácido sulfúrico en etanol. Las placas se dejaron secar y se calentaron en una estufa a 100°C durante 7 min. Los componentes lipídicos se observaron como bandas azules. Las placas se captaron por densitometría con el Chemidoc XRC (Bio Rad) y se cuantificaron con el programa Quantity One (Bio Rad).

5. BIOLOGÍA CELULAR

5.1 Silenciamiento génico mediante pequeños RNA de interferencia (siRNA) en hVSMCs y cardiomiocitos HL-1

Para inhibir o silenciar la expresión de LRP1 y de MMP-9 en las hVSMC y de LRP1, VLDL-r, LDL-r, Pyk2 y CatS en cardiomiocitos HL-1, se transfectaron las células con siRNAs de forma transitoria mediante la técnica de nucleofección, que permite la introducción de material genético mediante la aplicación de un campo eléctrico que permeabiliza la membrana plasmática y nuclear.

Para el silenciamiento de LRP1 en hVSMCs se nucleofectó un siRNA específico (600 nM) sintetizado por Ambion® a partir de una secuencia diana del mRNA del LRP1 publicada previamente por nuestro grupo (5'CGGCGGGGTCAGCAT-3') complementaria a la región 466-481 del mRNA del LRP1 [44, 153]. Los análisis de comparación de secuencia realizados en su momento, a través del programa informático *Genetic Computer Group package*, indicaron que esta secuencia no debería hibridar con secuencias de otros receptores (incluida la familia del receptor de las LDL) de la base de datos GenBank. En el silenciamiento específico de MMP9, se transfectaron las células con un siRNA comercial (siRNA-MMP9, 600 nM) (Ambion®, ref. AM 16704).

En los cardiomiocitos HL-1 se inhibieron diferentes genes con siRNAs (600nM) comerciales: LRP1, VLDLR y LDLR (Applied Biosystems; ref. 4390815; ID: 69313, s75976, s69154, respectivamente), Pyk2 (Ambion®, ref. 4390771, ID: s72404) y CatS (Ambion®, ref. AM 16708, ID: 161875).

En todos los casos, se empleó un siRNA-random (Ambion® ref. AM 4636) como control negativo de las transfecciones celulares.

Las transfecciones se llevaron a cabo con los reactivos de nucleofección incluidos en el AoSMC Nucleofector kit (Lonza Group Ltd, ref. VPC-1001) en el caso de las VSMCs y en el Cell Line Nucleofector kit L (Lonza Group Ltd, ref. VCA-1005) para los cardiomiocitos HL-1, empleando para ello un Nucleofector II Device de Lonza, con los programas A-033 y B-033 para las hVSMCs y los cardiomiocitos HL-1, respectivamente. Una vez transfectadas las células se mantuvieron en medio completo 48 horas para su recuperación. Transcurrido ese tiempo, las células se llevaron a quiescencia durante 24 horas, y después, tras sus respectivos

tratamientos se recogieron en el reactivo Tripure™ para el posterior aislamiento de RNA y de proteína total.

5.2 Silenciamiento farmacológico

En el primer artículo se hicieron tratamientos con distintos inhibidores de la fosforilación de ciertas proteínas implicadas en vías de señalización modificadas por la hipoxia. Para impedir la fosforilación de Pyk2, se empleó PP2 (50 μ M) (Calbiochem, ref. 529573) un inhibidor de la familia de las Src quinasas; mientras que para la inhibición de la fosforilación de ERK1/2, se usó el UO126 (10 μ M) (Cell Signaling, ref. #9903), un inhibidor altamente selectivo para MEK 1 y MEK 2. Tanto el PP2 como el UO126 se aplicaron a las células 2 h antes de exponer las células a hipoxia.

Por otro lado en el tercer artículo, se emplearon inhibidores de proteínas implicadas en la dinámica del calcio, como la Wortmannina (100nM) (Sigma-Aldrich Co, ref. W1628) y el K252a (15 μ M) (Calbiochem, ref. 420298). La Wortmannina es un potente inhibidor de la fosfatidilinosito 3-quinasa (PI3-K), mientras que el K252a bloquea la actividad de múltiples quinasas como la PKA y la PKC.

5.3 Ensayos de transfección transitoria

Los cardiomiocitos HL-1 fueron transfectados con un vector de expresión de HIF-1 α (pHIF-1 α , 10ng), amablemente proporcionado por el Dr. Luis del Peso (Departamento de Bioquímica, Universidad Autónoma, Madrid, España), y su correspondiente vector vacío (pcDNA3). La transfección se llevó a cabo con Lipofectamine® Reagent (Invitrogen™, ref. 18324-010), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células fueron recogidas en tampón de lisis (Tris-HCl 1M, KCl 1M, complete Mini EDTA-free inhibidor de proteasas (Roche Diagnostics ref. 11 936 170 001)) para testar HIF-1 α y SERCA2 por Western Blot.

5.4 Migración celular

Las hVSMCs y mVSMCs fueron sembradas en placas de cultivo celular y llevadas a la máxima confluencia posible. El estudio de la migración celular se realizó con un ensayo de cicatrización *in vitro*. Para llevarlo a cabo se realizó una “herida” en la monocapa celular con una punta de pipeta y se lavaron las placas con PBS1x para eliminar las células despegadas [109, 307]. Las células se mantuvieron en sus respectivos medios de quiescencia (tablas 1 y 2

m&m) y se fueron tomando fotografías de la herida a distintos tiempos con un microscopio Leica (Leica DM IRE2) con el programa Leica IM50 versión 5 *Release 247* (Leica Microsystems Digital Imaging, Cambridge). La capacidad migratoria de las células se midió cuantificando el porcentaje de cicatrización de la herida con el programa informático Image J (*NIH Image Software, National Institute of Health*).

5.5 Análisis inmunohistoquímicos

Las arterias coronarias obtenidas de los corazones explantados fueron incluidas en parafina y cortadas en secciones seriadas de 5 μm de grosor. Para la inmunohistoquímica, los cortes fueron desparafinados en xileno y rehidratados gradualmente en diferentes soluciones de etanol. Tras ello se lavaron en H_2O destilada y fueron sumergidos en una solución de metanol con H_2O_2 (10%) durante 30 min a TA para eliminar la actividad peroxidasa endógena. Las secciones se permeabilizaron con PBS-Tween1% 5 min a TA y se bloquearon con PBS-tween 0.1% y suero al 5% durante 30 min a TA. Tras la aplicación del kit Avidin Biotina (Vector Laboratories Inc, ref. SP-2001), las secciones fueron incubadas con su dilución específica de anticuerpo primario, pPyk2 (1:50), MMP9 (1:200), HIF-1 α (1:50), LRP1 (1:100) y α -actina (1:100) (tabla 11m&m) durante la noche (*overnight, o/n*) a 4°C. A continuación, se lavaron los cortes con PBS1x y se volvieron a incubar, esta vez con un anticuerpo secundario biotinilado (Vector Laboratories Inc) a una dilución 1:200 durante 1 h a TA. Por último, se lavaron los cortes con PBS1x y se aplicó un complejo peroxidasa avidin-biotina (ABC, Vector Laboratories, ref. PK-6100) durante 30 min a TA. El color fue revelado mediante el cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Roche Farma, ref. 11 718 096 001). Para las tinciones nucleares, los cortes se incubaron durante 2 min en Hematoxilina Mayer (Panreac Applichem, ref. 254766.1610). Las imágenes fueron capturadas con un microscopio Nikon Eclipse 80i, digitalizadas con la cámara Retiga 1300i Fast y analizadas con el programa informático Image J (*NIH Image Software, National Institute of Health*).

5.6 Inmunofluorescencia indirecta

La inmunofluorescencia indirecta se realizó en células sembradas en placas μ -dish^{35mm}low (Ibidi, ref. 80136) y en secciones seriadas de parafina de arterias coronarias humanas y de ventrículo izquierdo procedentes de donantes sometidos a trasplante de miocardio en el Hospital Santa Creu i Sant Pau (Barcelona, España) con la aprobación del Comité Ético del hospital.

Los cortes de coronarias humanas se incubaron con los anticuerpos primarios pPyk2 (1:50), Pyk2 Total (1:50) y MMP-9 (1:200) y con sus respectivos anticuerpos secundarios conjugados con Cy3- y Cy5- (Jackson Immuno Research Laboratories). Las fibras de actina se tiñieron con Phalloidina 568 (Invitrogen™, ref. A12380, dilución 1:40).

Los cortes de ventrículo izquierdo se incubaron con los anticuerpos primarios LRP-1 β (1:100), SERCA2 (1:50) y pPyk2 (1:50) a 4° o/n. Seguidamente las secciones de tejido fueron incubadas con anticuerpos secundarios conjugados con Alexa 633, Cy3 y Alexa 488 (Jackson ImmunoResearch Laboratories) respectivamente, a 37°C durante 1h. Finalmente, los cortes se tiñeron 10 min con DAPI 1:1000 (Sigma-Aldrich Co, ref. 32670) y fueron analizados en un microscopio de confocal Axio Observer Z1 (Zeiss).

Para los ensayos celulares en placas μ -dish^{35mm}low, primero se fijaron las células con paraformaldehído al 4% y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.2%. Las hVSMCs se incubaron con pPyk2 (1:50) y MMP9 (1:200). Los cardiomiocitos HL-1 controles y deficientes en LRP1 tratados con 50 μ g/mL DiI-(VLDL+IDL), se incubaron con TE (1:50) y CatS (1:50). Los cardiomiocitos HL-1 control y LRP-1 deficientes, tratados con 8 h de hipoxia, se incubaron con anticuerpos anti-pPyk2 (1:50) y anti-SERCA2 (1:50).

En todos los casos los núcleos celulares se tiñeron con Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich Co, ref. B2261). Las placas fueron analizadas con un microscopio confocal de fluorescencia invertida (Leica TCS NT) y procesadas con un programa informático estándar TCSNT, versión 1.3.237 (Leica).

5.7 Estrés oxidativo

Los niveles de estrés oxidativo se midieron mediante la detección de radicales libres con dihidroetidio (DHE, Invitrogen, D-23107). El DHE es un fluoróforo químicamente reducido que en el citoplasma tiene una fluorescencia azul, pero la combinación con radicales oxidantes hace que se oxide originando un producto fluorescente rojo. Tras el tratamiento con hipoxia, las células fueron expuestas a DHE 10⁻⁵ M durante 30 min a 37°C y se lavaron dos veces con PBS 1x para eliminar el DHE que no se hubiera oxidado. El estrés oxidativo se midió con un microscopio de fluorescencia (Leica DM IRe2). Las imágenes se tomaron con una exposición de 200 ms, la ganancia fue del 1x y un aumento 10x. La superficie fluorescente se cuantificó con el programa Image J (*NIH Image Software, National Institute of Health*).

5.8 Manejo del calcio intracelular

La detección de los cambios en el manejo de calcio intracelular se realizaron cargando los cultivos celulares de cardiomiocitos HL-1 con 2 μ M de CAL-520 (AAT Bioquest, ref.#21130) durante 20 min a TA. El CAL-520 fue excitado a 488 nm y la fluorescencia de emisión fue recolectada entre 505 y 650 nm. Los cambios en el calcio intracelular se estimaron normalizando la emisión de fluorescencia (F) con la emisión basal de fluorescencia (F₀). El contenido de calcio del SR se estimó con la amplitud de onda producida por la exposición de los cardiomiocitos a 10mM de cafeína durante 20 seg con un flujo de 145.4 mm/seg. Las medidas se tomaron con un microscopio de confocal Leica SP5 AOBS.

6. BIOLOGÍA MOLECULAR

6.1 Análisis de la actividad de las metaloproteasas (MMPs)

La actividad gelatinolítica de MMP-9 y MMP-2 fue medida mediante zimografía.

6.1.1 Preparación de las muestras

Primero, los sobrenadantes de los cultivos celulares se centrifugaron durante 15 min a 3000 rpm a 4°C para decantar las células muertas. A continuación, las muestras se dializaron en un tampón NH₄HCO₃ 0.01M para eliminar las sales, se liofilizaron y se resuspendieron en una solución RIPA (tabla 8 m&m) suplementado con un inhibidor de proteasas (Complete Mini EDTA-free, Roche).

Solución RIPA
NaCl 150 mM
Triton X-100 1% (v/v)
C₂₉H₃₉O₄Na 0.5% (w/v)
SDS 0.1% (w/v)
EDTA 2 mM
Tris-HCl 50 mM (pH 8)

Tabla 8 m&m. Composición solución RIPA.

6.1.2 Zimografía

Las muestras en RIPA se mezclaron con una solución de carga 6x no reductora y se cargaron en un gel SDS-polyacrilamida al 10% con 1 mg/ml de gelatina A porcina (Sigma-

Aldrich, ref. G1890), como sustrato para la actividad enzimática de las MMPs. Tras 4-6 h de electroforesis a 4°C, los geles se lavaron a TA durante 30 min con 2.5% de Triton X-100 (Sigma) y se incubaron a 37°C durante 18-20 h en una solución sustrato (Tabla 9 m&m).

Solución sustrato, pH8
Tris-HCl 50 mM
CaCl ₂ 10 mM
N ₃ Na 0.02% (w/v)

Tabla 9 m&m. Composición de la solución sustrato para la activación de las MMPs.

Después de la incubación, los geles se tiñeron en una solución de ácido acético (10%) con una tableta PhastGel™ Blue R (GE Healthcare, ref. 17-0518-01). Las áreas con actividad enzimática aparecieron como bandas claras sobre un fondo azul no digerido por las proteasas.

Finalmente, los geles fueron escaneados en un densitómetro GS-800 (BioRad) y las bandas digeridas se cuantificaron usando el software Quantity-One (BioRad).

6.2 Análisis de la expresión de mRNA y niveles de proteína

Para la extracción del RNA total y de la proteína total, las células se recogieron en Tripure™ *Isolation Reagent* (Roche), reactivo que permite el aislamiento del RNA y de las proteínas basándose en sus diferencias de solubilidad en distintos solventes orgánicos.

6.2.1 PCR

Primeramente, se aisló el RNA total siguiendo las instrucciones del fabricante del Tripure™ *Isolation Reagent* (Roche).

La **integridad del RNA** se comprobó mediante una electroforesis horizontal en un gel de agarosa TBE 1%, teñido con bromuro de etidio (BrEt) 0.4 µg/mL. Para la preparación de la muestra se mezcló 1 µL de RNA total, 9 µL de H₂O autoclavada y 2 µL de azul de bromofenol con BrEt, y la mezcla se calentó a 65°C durante 7 min. Se aplicó al gel una corriente eléctrica de un máximo de 80 V para la migración de los ácidos nucleicos con carga negativa. Mediante un transiluminador con luz ultravioleta a 260 nm se comprobó la integridad del RNA.

La **concentración del RNA total** se realizó leyendo la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 260 nm en un espectrofotómetro NanoDrop ND-100 (NanoDrop Technologies). La pureza óptima del RNA vino indicada por los valores cercanos a 2 de la relación de absorbancias a 260/280.

El DNA complementario (cDNA) se sintetizó a partir del RNA total mediante retrotranscripción (RT-PCR) con una transcriptasa reversa. Para **la síntesis de cDNA** se utilizó el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, ref. 4368813). Por cada muestra se mezclaron 1.5 µg de RNA total, 2 µL de RTbuffer, 0.8 µL de dNTP, 2 µL de primers aleatorios y 1 µL de enzima Multiscribe™, y se completó hasta 20 µL con H₂O RNase free. La reacción RT-PCR consistió en un ciclo de 10 min a 25°C y otro de 2 h a 37°C, y se llevó a cabo en un equipo Gene Amp® PCR System 9700 (Applied Biosystems).

Para el **análisis de la expresión génica**, se empleó la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (q-RT-PCR). Los equipos usados fueron la PCR-7000 y PCR-7900 Sequence Detection System de ABI PRISM (Applied Biosystems). La reacción se llevó a cabo utilizando 1 µl de cDNA (1,5 µg de RNA total), 10 µl de la Taqman Universal Master Mix (Applied Biosystems, ref. 4326708) y una mezcla comercial de sonda (200 nM) y primers (300 nM) (Assays on Demand, Applied Biosystems) específica para cada gen estudiado (tabla 10 m&m). Las muestras se calentaron durante 10 min a 95°C y después se realizaron 40 ciclos a 95°C (15 seg) y 60°C (1 min). Los Ct de los genes estudiados se normalizaron con los Ct de los genes endógenos, genes que no se modifican por los diferentes tratamientos aplicados a las células, por lo que la cuantificación de su expresión permite obtener la cantidad relativa de RNAm para cada muestra.

LISTADO DE GENES			
Genes humanos		Genes murinos	
Gen	Referencia	Gen	Referencia
LRP1	Hs00233899_m1	LRP1	Mm00464608_m1
MMP9	Hs00234579_m1	VLDLR	Rn1498166_m1
MMP2	Hs00234422_m1	LDLR	Mn01151339_m1
IL-1β	Hs00174097_m1	SERCA2	Rn01499537_m1
MCP-1	HS00234140_m1	RyR2	Rn01470303_m1
IL-6	Hs00174131_m1	IP3-RI	Rn01425720_m1
TBP	4326322E	IP3-RIII	Rn00681974_m1
		MMP2	Mm00439498_m1
		MMP9	Mm00600163_m1
		Rplp0	Rn00821065_g1

Tabla 10 m&m. Referencia de las sondas y oligos empleados (Applied Biosystems).

6.2.2 Western Blot

La expresión proteica se midió mediante la técnica Western Blot. La proteína se aisló siguiendo el procedimiento del reactivo Tripure™ *Isolation Reagent* (Roche), se resuspendió en SDS al 1% y se cuantificó mediante el método BCA.

Se cargaron de 15 a 50 µg de proteína en geles de poliacrilamida al 10-15% con SDS para separar las proteínas en función de su peso molecular. A continuación las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa 0,45 µm (BioRad) y se comprobó su correcta transferencia a través de la tinción reversible Ponceau (Fluka) al 0.2% en ácido acético al 0.1%. Dependiendo de la proteína, las membranas se bloquearon en tampón TBS-Tween 20 (0.1 M NaCl, 10 mM Tris Base, pH 7.4, 0.05% Tween20) con BSA o con leche desnatada en polvo al 5%, 1h a TA o a 4°C o/n.

Una vez bloqueadas, las membranas se incubaron con la dilución adecuada de anticuerpo primario (tabla 11 m&m) disuelto en la solución de bloqueo durante 2 h a TA u o/n a 4°C. Después de la incubación, se lavaron las membranas 3 veces durante 5 min con TBS-Tween 20 para eliminar el exceso de anticuerpo no adherido a la membrana y se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario (1:10000) durante 1 h a TA. Se hicieron 3 lavados con TBS-Tween 20 más uno adicional de TBS durante 5 min. Las membranas se revelaron con el sustrato Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, ref. RPN 2232) que reacciona con la peroxidasa de rábano conjugada con el anticuerpo secundario, dando lugar a un sustrato quimioluminiscente. Se empleó un equipo Chemidoc XRS (BioRad) para captar la luminiscencia y el programa Quantity One (BioRad) para cuantificar la densidad de las bandas originadas.

Las membranas se deshibridaron con la solución Restore Western Blot Stripping Buffer (Thermo Scientific, ref. 21059) durante 15 min con agitación fuerte para poder reciclarlas e incubarlas con otros anticuerpos, como la β-Tubulina que se utilizó como control de la proteína total cargada.

Los anticuerpos secundarios utilizados fueron un cabra anti-conejo (Dako, P0448) y un conejo anti-ratón (Dako, 0161).

MATERIALES Y MÉTODOS

LISTADO DE ANTICUERPOS PRIMARIOS PARA WESTERN BLOT	
RECEPTORES LIPOPROTEICOS	
LRP1-β, 85kDa (Epitomics, #2703-1)	
Condiciones del gel	15 μg de proteína, gel al 10%, condiciones reductoras
Anticuerpo primario	Conejo, monoclonal, 1:7000, en leche al 5%
Anticuerpo secundario	Cabra anti-conejo, 1:10000
LRP1-β, 85kDa (Fitzgerald, 10R-L107c, clone 8B8)	
Condiciones del gel	15 μg de proteína, gel al 10%, condiciones no reductoras
Anticuerpo primario	Ratón, monoclonal, 1:50, en leche al 5%
Anticuerpo secundario	Conejo anti-ratón, 1:10000
LDLR, 236kDa (Epitomics, #1956-1)	
Condiciones del gel	25 μg de proteína, gel al 7.5%, condiciones no reductoras
Anticuerpo primario	Conejo, monoclonal, 1:250, en leche al 5%
Anticuerpo secundario	Cabra anti-conejo, 1:10000
VLDLR, 161kDa (Santa Cruz Biotechnology, sc-18824)	
Condiciones del gel	25 μg de proteína, gel al 7.5%, condiciones no reductoras
Anticuerpo primario	Ratón, monoclonal, 1:100, en leche al 5%
Anticuerpo secundario	Conejo anti-ratón, 1:10000
PROTEÍNAS NF-κβ	
Phospho-NF-κB P65, 65kDa (Cell Signaling Technology, #3039)	
Condiciones del gel	30 μg, gel al 10%, condiciones reductores
Anticuerpo primario	Conejo, policlonal, 1:1000, en BSA al 5%
Anticuerpo secundario	Cabra anti-conejo, 1:10000
NF-κB P65, 65kDa (Cell Signaling Technology, #4764)	
Condiciones del gel	30 μg, gel al 10%, condiciones reductores
Anticuerpo primario	Conejo, monoclonal, 1:2000, en BSA al 5%
Anticuerpo secundario	Cabra anti-conejo, 1:10000
IκBα, 39kDa (Cell Signaling Technology, #4812)	
Condiciones del gel	30 μg, gel al 10%, condiciones reductores
Anticuerpo primario	Conejo, monoclonal, 1:1000, en BSA al 5%
Anticuerpo secundario	Cabra anti-conejo, 1:10000
α-Nucleolina, 100kDa (Cell Signaling Technology, #12247)	
Condiciones del gel	30 μg, gel al 10%, condiciones reductores
Anticuerpo primario	Conejo, policlonal, 1:1000, en leche al 5%
Anticuerpo secundario	Cabra anti-conejo, 1:10000
SEÑALIZACIÓN MAPK	
Phospho-Pyk2, 116kDa (Cell Signaling Technology, #3291)	
Condiciones del gel	30 μg, gel al 10%, condiciones reductores
Anticuerpo primario	Conejo, policlonal, 1:1000, en BSA al 5%
Anticuerpo secundario	Cabra anti-conejo, 1:10000
Pyk2 Total, 116kDa (Cell Signaling Technology, #3480)	
Condiciones del gel	30 μg, gel al 10%, condiciones reductores
Anticuerpo primario	Ratón, monoclonal, 1:1000, en leche al 5%
Anticuerpo secundario	Conejo anti-ratón, 1:10000
Phospho-ERK1/2; 42,44 kDa (Cell Signaling Technology, #9101)	
Condiciones del gel	30 μg, gel al 10%, condiciones reductores
Anticuerpo primario	Conejo, policlonal, 1:1000, en BSA al 5%
Anticuerpo secundario	Cabra anti-conejo, 1:10000
ERK1/2 Total; 42,44kDa (Assay Desing, KAP-MA001)	
Condiciones del gel	30 μg, gel al 10%, condiciones reductores
Anticuerpo primario	Conejo, policlonal, 1:1000, en leche al 5%
Anticuerpo secundario	Cabra anti-conejo, 1:10000
Phospho-Src, 60kDa (Cell Signaling Technology, #2105)	
Condiciones del gel	30 μg, gel al 10%, condiciones reductores
Anticuerpo primario	Conejo, policlonal, 1:1000, en BSA al 5%
Anticuerpo secundario	Cabra anti-conejo, 1:10000
Src Total, 60kDa (Cell Signaling Technology, #2109)	
Condiciones del gel	30 μg, gel al 10%, condiciones reductores
Anticuerpo primario	Conejo, monoclonal, 1:1000, en leche al 5%
Anticuerpo secundario	Cabra anti-conejo, 1:10000

MATERIALES Y MÉTODOS

Phospho-Akt, 60kDa (Cell Signaling Technology, #4056)	
Condiciones del gel	15 µg, gel al 10%, condiciones reductores
Anticuerpo primario	Conejo, monoclonal, 1:1000, en BSA al 5%
Anticuerpo secundario	Cabra anti-conejo, 1:10000
Akt Total, 60kDa (Cell Signaling Technology, #4685)	
Condiciones del gel	15 µg, gel al 10%, condiciones reductores
Anticuerpo primario	Conejo, monoclonal, 1:1000, en leche al 5%
Anticuerpo secundario	Cabra anti-conejo, 1:10000
PROTEÍNAS DEL CALCIO	
SERCA2; 114-140 kDa (Cell Signaling Technology, #9580)	
Condiciones del gel	30µg, gel al 10%, condiciones reductoras
Anticuerpo primario	Conejo, monoclonal, 1:1000, en BSA al 5%
Anticuerpo secundario	Cabra anti-conejo, 1:10000
NCX-1, 130kDa (Alomone labs, #ANX-011)	
Condiciones del gel	30µg, gel al 7.5%, condiciones reductoras
Anticuerpo primario	Conejo, policlonal, 1:200, en leche al 5%
Anticuerpo secundario	Cabra anti-conejo, 1:10000
CA_v1,2; 220kDa (Alomone labs, #ACC-003)	
Condiciones del gel	30µg, gel al 7.5%, condiciones reductoras
Anticuerpo primario	Conejo, policlonal, 1:200, en leche al 5%
Anticuerpo secundario	Cabra anti-conejo, 1:10000
Phospho-PLN; 24kDa (Cell Signaling Technology, #8496)	
Condiciones del gel	15µg, gel al 15%, condiciones reductoras
Anticuerpo primario	Conejo, policlonal, 1:1000, en BSA al 5%
Anticuerpo secundario	Cabra anti-conejo, 1:10000
PLN Total; 24kDa (Cell Signaling Technology, #8495)	
Condiciones del gel	15µg, gel al 15%, condiciones reductoras
Anticuerpo primario	Conejo, policlonal, 1:1000, en leche al 5%
Anticuerpo secundario	Cabra anti-conejo, 1:10000
OTROS	
HIF-1α, 97kDa (Novus Biologicals, NB100-105)	
Condiciones del gel	50µg, gel al 10%, condiciones reductoras
Anticuerpo primario	Ratón, monoclonal, 1:500, leche al 5%
Anticuerpo secundario	Conejo anti-ratón, 1:5000
Dilución ^a	1:50
PDGF-B; 34kDa (Santa Cruz Biotechnology, sc-365805)	
Condiciones del gel	30µg, gel al 15%, condiciones reductoras
Anticuerpo primario	Ratón, monoclonal, 1:200, en leche al 5%
Anticuerpo secundario	Conejo anti-ratón, 1:10000
PDGF Rβ, 124kDa (R&D Systems)	
Condiciones del gel	30µg, gel al 7.5%, condiciones no reductoras
Anticuerpo primario	Ratón, monoclonal, 1:1000, en leche al 5%
Anticuerpo secundario	Conejo anti-ratón, 1:10000
Catepsina S; 24, 37kDa (Santa Cruz Biotechnology, sc-271619)	
Condiciones del gel	30µg, gel al 12%, condiciones reductoras
Anticuerpo primario	Ratón, monoclonal, 2:100, en leche al 5%
Anticuerpo secundario	Conejo anti-ratón, 1:10000
PLIN-5, 50kDa (Novus Biologicals, NB110-60509)	
Condiciones del gel	30µg, gel al 10%, condiciones reductoras
Anticuerpo primario	Conejo, policlonal, 1:1000, en leche al 5%
Anticuerpo secundario	Cabra anti-conejo, 1:10000
PROTEÍNAS ENDÓGENAS	
β-Tubulina, 50kDa (Abcam, Ab6046)	
Condiciones del gel	Membranas deshidratadas
Anticuerpo primario	Conejo, policlonal, 1:1000
Anticuerpo secundario	Cabra anti-conejo, 1:10000, en leche al 5%

Tabla 11 m&m. Listado de anticuerpos primarios. Referencia y condiciones de los anticuerpos primarios empleados en los análisis de Western Blot.

6.3 Aislamiento de extractos nucleares y citosólicos a partir de hVSMCs

Los extractos nucleares y citosólicos se obtuvieron a partir de hVSMCs expuestas a hipoxia 4, 8 y 18 horas en ausencia o presencia de PP2 (50 μM), empleando el kit *Protein and RNA Isolation SystemTM* (Ambion Inc., Austin, TX), siguiendo las instrucciones del fabricante.

6.4 Inmunoprecipitación de LRP1 total.

La formación de complejos LRP1-pPyk2 se analizó mediante inmunoprecipitación. Para ello, 50 μL de Dynabeads Protein G (Novex, Life Technologies, ref. 10003D) se incubaron con el anticuerpo de la cadena β del LRP1 (Epitomics, ref. 2703-1, dilución 1:50) durante 10 min a TA en un agitador orbital. A continuación, los extractos de proteína celular fueron incubados con los complejos Dynabeads- β LRP1 durante 30 min a TA en el mismo agitador orbital. Previamente a la elución de los complejos Dynabeads-anticuerpo-antígeno, estos se lavaron 4 veces en PBS1x. Las muestras se cargaron en geles de poliacrilamida SDS-PAGE para llevar a cabo un Western Blot y las membranas se incubaron con el anticuerpo para pPyk2 (Cell Signaling Technology, #3291).

7. TECNICAS FÍSICAS

Los sobrenadantes de los cardiomiocitos HL-1 fueron centrifugados a 3000 xg durante 5 min a TA para eliminar los lípidos no captados por las células. El precipitado fue descartado y el sobrenadante restante fue congelado y empleado para la caracterización física de la tropoelastina.

7.1 Espectroscopía Infrarroja por Transformadas de Fourier (FITR)

El espectro infrarrojo por transformadas de Fourier/reflectancia total atenuada (FITR/ATR) se adquirió usando un Nicolet 5700 FITR (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) equipado con un dispositivo ATR con un divisor de haz de KBr y un detector MCT/B. El accesorio ATR empleado fue un Smart Orbit con cristal de diamante tipo IIA (índice de refracción 2.4). El espectro se grabó en la región 4000-450 cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1} y 80 acumulaciones. Los datos del espectro se recolectaron usando Omnic 7.3 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Antes de cada experimento se recolectó un solo haz del cristal de diamante limpio para usarlo como fondo y restarlo al

espectro. A continuación los espectros se someten a ATR para realizar las correcciones de la línea base.

Para cada tipo de sobrenadante o tejido, se escogió un espectro representativo y se calculó la segunda derivada. Estas segundas derivadas se usaron para mejorar la información química presente en las bandas de absorción de infrarrojos de solapamiento de espectros. Las bandas de absorción se identificaron usando bandas de absorción FTIR de tejidos biológicos, proteínas y péptidos.

7.2 Análisis termogravimétrico

El análisis se llevó a cabo en un molde de alúmina, con una masa inicial de 7 mg, entre 25 y 650°C a 10°C/min bajo una atmósfera de N₂ usando la TGA Q50 (TA Instruments, New Castle, DE).

7.3 Escaneo calorimétrico diferencial (DSC)

Los análisis se realizaron usando un DSC Pyris calorimétrico (Perkin Elmer, Waltham, MA). El calorímetro fue calibrado usando Hg e In como estándares, que resultan en una temperatura precisa de $\pm 0.1^\circ\text{C}$ y una entalpía de ± 0.2 J/g. Las muestras, 5 mg, fueron puestas en moldes de aluminio y equilibradas a una temperatura inicial 5 min antes de empezar a calentar 20°C por min. Los parámetros de transición fueron procesados usando el programa informático calorimétrico DSC Pyris.

**INFORME DEL FACTOR DE IMPACTO DE LOS ARTÍCULOS
PUBLICADOS Y DE LA PARTICIPACIÓN DEL DOCTORANDO**

ARTÍCULO 1

Hypoxia Induces Metalloproteinase-9 Activation and Human Vascular Smooth Muscle Cell Migration Through Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1-Mediated Pyk2 Phosphorylation

TITULO TRADUCIDO: La hipoxia induce la activación de la Metaloproteinasas-9 y la migración de células musculares lisas vasculares humanas a través del receptor *Low density lipoprotein receptor-related protein-1* mediante la fosforilación de Pyk2.

REVISTA: Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2013; 33:2877-2887.

FACTOR DE IMPACTO DE LA REVISTA: 7.235

AUTORES: **Elena Revuelta-López**¹, José Castellano¹, Santiago Roura², Carolina Gálvez-Montón², Laura Nasarre¹, Sonia Benitez³, Antoni Bayes-Genis², Lina Badimon¹, Vicenta Llorente-Cortés¹.

¹Centro de Investigación Cardiovascular CSIC-ICCC, IIB-Sant Pau, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, España.

²ICREC, Programa de Investigación, Fundació Institut d'Investigación en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol (IGPT), Badalona, España.

³Grupo de Bioquímica Cardiovascular, Instituto de Investigación Biomédica de Sant Pau, IIB-Sant Pau, Barcelona, España.

RESUMEN

Objetivos. La hipoxia altera la función vascular promoviendo el remodelado de la matriz extracelular. La integridad de la matriz extracelular y su composición están moduladas mediante metaloproteinasas (MMPs). Nuestro objetivo fue investigar el papel del receptor *Low density lipoprotein receptor-related protein-1* (LRP1) en la regulación de la activación MMP-9/MMP-2 y la migración de las células musculares lisas vasculares (hVSMCs) en respuesta a la hipoxia, y elucidar la vía de señalización celular involucrada en este proceso.

Métodos y resultados. Los análisis de Western Blot mostraron que la hipoxia induce la fosforilación de Pyk2 a la vez que la expresión de LRP1 en hVSMCs. El silenciamiento de LRP1 mediante siRNA o el tratamiento con PP2, un inhibidor de la familia Src quinasas, evita la fosforilación de Pyk2 inducida por la hipoxia. Los experimentos de coimmunoprecipitación mostraron que el aumento de inmunoprecipitados de pPyk2/LRP1β

inducidos por la hipoxia son menores en hVSMCs tratadas con PP2. El silenciamiento de LRP1 y el tratamiento con PP2 fueron también altamente efectivos en la prevención de la activación de MMP-9 y la migración celular inducidos por la hipoxia. Los experimentos de subfraccionamiento celular revelaron que los efectos de PP2 podrían deberse a que evita la translocación del factor nuclear- $\kappa\beta$ al núcleo inducida por la hipoxia. Finalmente, las mediciones de ELISA mostraron que en hipoxia, el silenciamiento del LRP1 pero no el tratamiento de PP2, incrementa la secreción de interleuquina-1 β , interleuquina-6 y la proteína quimioatrayente de monocitos 1 en hVSMCs.

Conclusiones. Nuestros resultados determinan que el receptor LRP1, a través de la fosforilación de Pyk2, tiene un papel crucial en la activación de MMP-9 y la migración de hVSMCs inducida por la hipoxia. Ambos, el silenciamiento de LRP1 y el tratamiento con PP2, inducen un fenotipo pro-inflamatorio de las hVSMCs en hipoxia. Sin embargo, es necesario realizar muchos más estudios para poder establecer estrategias terapéuticas eficientes que modulen el remodelado vascular y la inflamación asociadas a enfermedades vasculares relacionadas con la hipoxia.

PARTICIPACIÓN DEL DOCTORANDO: La directora de la tesis CERTIFICA que Elena Revuelta López participó en el artículo **Hypoxia Induces Metalloproteinase-9 Activation and Human Vascular Smooth Muscle Cell Migration Through Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1-Mediated Pyk2 Phosphorylation** de la siguiente manera:

Participó en el diseño experimental; hizo el aislamiento, el cultivo y los tratamientos de las células musculares lisas de arteria coronaria humana y de ratón; procesó las muestras para PCR a tiempo real, Western Blot, zimografía, inmunohistoquímica e inmunoprecipitación; realizó los ensayos de migración celular y estrés oxidativo; analizó resultados; redactó parte de la metodología y colaboró en la corrección del artículo.

La directora: Vicenta Llorente Cortés

ARTÍCULO 2

Cardiomyocyte intracellular cholesteryl ester accumulation promotes tropoelastin physical alteration and degradation. Role of LRP1 and cathepsin S

TITULO TRADUCIDO: La acumulación intracelular de ésteres de colesterol en el cardiomiocito, promueve alteraciones físicas y degradación de tropoelastina. Papel del receptor LRP1 y de catepsina S.

REVISTA: The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2014; 55:209-219.

FACTOR DE IMPACTO: 4.24

AUTORES: Valerie Samouillan^{1*}, **Elena Revuelta-López^{2*}**, Jany Dandurand¹, Laura Nasarre², Lina Badimon², Colette Lacabanne¹, Vicenta Llorente-Cortés².

¹Physique des Polymères, Institut Carnot, CIRIMAT UMR 5085, Université Paul Sabatier, Bat 3R1B2, 118 route Narbonne, 31062 Toulouse Cedex 04, France.

²Centro de Investigación Cardiovascular CSIC-ICCC, IIB-Sant Pau, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, España.

* These authors have contributed equally to the manuscript.

RESUMEN

Objetivo. La dislipemia tiene un impacto directo en el remodelado cardiaco alterando los componentes de la matriz extracelular (MEC). Uno de los componentes principales de la MEC es la elastina, una red proteica tridimensional que puede ser degradada de forma muy eficiente por catepsinas. En estados de dislipemia, resistencia a la insulina e hiperlipoproteinemia combinada, los niveles de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) ricas en triglicéridos (TG) aumentan. Este aumento en la concentración de VLDL promueve, a través del LRP1, la acumulación intracelular de colesterol esterificado (CE) en el cardiomiocito. El objetivo de este trabajo fue analizar el efecto de la acumulación intracelular de CE en el cardiomiocito sobre las características de la tropoelastina (TE) e investigar el papel del LRP1 y de la catepsina S (CatS) en estos efectos.

Resultados. Los estudios moleculares demostraron que la deficiencia de LRP1 disminuía la captación selectiva de CE de lipoproteínas ricas en TG-CE (VLDL-IDL) y lipoproteínas ricas

en CE (LDL modificadas por agregación, LDLag), produciéndose menor acumulación de CE en los cardiomiocitos. Los ensayos bioquímicos y de microscopía confocal mostraron que la acumulación intracelular de CE mediada por LRP1 incrementaba los niveles proteicos de la forma madura de CatS e inducía una alteración estructural de la TE intracelular en los cardiomiocitos. Por otro lado, los estudios biofísicos evidenciaron que la acumulación de CE intracelular mediada por LRP1, reducía la Tg2 (temperatura de transición) de la TE. Además, la inhibición de CatS prevenía las alteraciones estructurales y las modificaciones de la Tg2 de la TE.

Conclusión. Estos resultados demuestran que la acumulación intracelular de CE mediada por el receptor LRP1 en cardiomiocitos expuestos a VLDL produce alteraciones estructurales y físicas en la TE secretada debido a un aumento en los niveles proteicos de la forma madura de la CatS. Por lo tanto, la modulación de la función del LRP1 podría regular el remodelado ventricular y patologías caracterizadas por un aumento en las concentraciones de VLDL, tales como con la resistencia a la insulina y la hiperlipoproteinemia combinada.

PARTICIPACIÓN DEL DOCTORANDO: La directora de la tesis CERTIFICA que Elena Revuelta López participó en el artículo **Cardiomyocyte intracellular cholesteryl ester accumulation promotes tropoelastin physical alteration and degradation. Role of LRP1 and cathepsin S** de la siguiente manera:

Participó en el diseño experimental; hizo el cultivo y los tratamientos de los cardiomiocitos HL-1; realizó la agregación de las LDL; procesó las muestras para Western Blot, cromatografía en capa fina y microscopía confocal; analizó resultados; redactó parte de la metodología y colaboró en la corrección del artículo.

La directora: Vicenta Llorente Cortés

ARTÍCULO 3

Hypoxia-driven sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2 (SERCA2) downregulation depends on low-density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP1)-signaling in cardiomyocytes

TITULO TRADUCIDO: La regulación a la baja del *sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2* (SERCA2) en hipoxia depende de la señalización del receptor *low-density lipoprotein receptor-related protein-1* (LRP1) en cardiomiocitos.

REVISTA: Journal of Molecular and Cellular Cardiology

FACTOR DE IMPACTO: 5.218

AUTORES: **Elena Revuelta-López**¹, Roi Cal¹, Adela Herraiz¹, David de Gonzalo-Calvo¹, Laura Nasarre¹, Santiago Roura², Carolina Galvez-Monton², Antoni Bayes-Genis², Lina Badimon¹, Leif Hove-Madsen¹, Vicenta Llorente-Cortés¹.

¹Centro de Investigación Cardiovascular CSIC-ICCC, IIB-Sant Pau, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, España.

²ICREC, Programa de Investigación, Fundació Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol (IGPT), Badalona, España.

RESUMEN

Objetivo. El mantenimiento de la actividad de la bomba de Ca²⁺ del retículo sarcoplásmico, *sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase* (SERCA2), es crucial para el correcto funcionamiento cardíaco. SERCA2 disminuye drásticamente en corazones isquémicos. Existen datos controvertidos sobre la modulación de SERCA2 por Pyk2, una proteína quinasa rica en prolina, en los cardiomiocitos. Trabajos previos de nuestro grupo muestran que la hipoxia regula a la alza la fosforilación de Pyk2 (pPyk2) de una forma dependiente de la expresión del *low-density lipoprotein receptor-related protein 1* (LRP1). Nuestros objetivos fueron investigar el papel del receptor LRP1 en la bajada de expresión de SERCA2 en cardiomiocitos causada por la hipoxia y establecer los mecanismos de señalización implicados.

Resultados. Los ensayos de Western Blot mostraron que la hipoxia reduce SERCA2 a la vez que aumenta los niveles proteicos de LRP1 y pPyk2 en cardiomiocitos HL-1. La deficiencia de LRP1 en cardiomiocitos previene la disminución de SERCA2 y la reducción de la onda de Ca²⁺ al impedir la activación de la vía Akt/Pyk2 y la acumulación de HIF-1 α por la hipoxia. Además, la inhibición de la fosforilación de Pyk2 (con PP2, inhibidor de las quinasas Src) o el silenciamiento específico de Pyk2 (mediante un siRNA-antiPyk2) mantiene niveles bajos de HIF-1 α y elevados de SERCA2 en condiciones de hipoxia.

Conclusiones. El eje LRP1/Akt/Pyk2 reprime la expresión de mRNA de SERCA2 vía HIF-1 α , dado que al sobreexpresar HIF-1 α se elimina el efector protector de la deficiencia de LRP1 y disminuye SERCA2. Nuestros resultados muestran el papel crucial de la vía LRP1/Akt/Pyk2/HIF-1 α en la disminución de la expresión de SERCA2 en cardiomiocitos en situación de isquemia, un proceso fisiopatológico cercano al fallo cardíaco.

PARTICIPACIÓN DEL DOCTORANDO: La directora de la tesis CERTIFICA que Elena Revuelta López participó en el artículo **Hypoxia-driven sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2 (SERCA2) downregulation depends on low-density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP1)-signaling in cardiomyocytes** de la siguiente manera:

Participó en el diseño experimental; hizo el cultivo, los ensayos de transfección transitoria y los tratamientos de los cardiomiocitos HL-1; procesó las muestras para PCR a tiempo real, Western Blot y microscopía confocal; participó en los estudios del manejo del calcio; analizó resultados; redactó parte de la metodología y colaboró en la corrección del artículo.

La directora: Vicenta Llorente Cortés

RESULTADOS

RESULTADOS: ARTÍCULO 1

Hypoxia Induces Metalloproteinase-9 Activation and Human Vascular Smooth Muscle Cell Migration Through Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1-Mediated Pyk2 Phosphorylation

TITULO TRADUCIDO: La hipoxia induce la activación de la Metaloproteinasas-9 y la migración de células musculares lisas vasculares humanas a través del receptor *Low density lipoprotein receptor-related protein-1* mediante la fosforilación de Pyk2.

REVISTA: Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2013; 33:2877-2887.

AUTORES: **Elena Revuelta-López**¹, José Castellano¹, Santiago Roura², Carolina Gálvez-Montón², Laura Nasarre¹, Sonia Benitez³, Antoni Bayes-Genis², Lina Badimon¹, Vicenta Llorente-Cortés¹.

¹Centro de Investigación Cardiovascular CSIC-ICCC, IIB-Sant Pau, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, España.

²ICREC, Programa de Investigación, Fundació Institut d'Investigación en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol (IGPT), Badalona, España.

³Grupo de Bioquímica Cardiovascular, Instituto de Investigación Biomédica de Sant Pau, IIB-Sant Pau, Barcelona, España.

Translational Science

Hypoxia Induces Metalloproteinase-9 Activation and Human Vascular Smooth Muscle Cell Migration Through Low-Density Lipoprotein Receptor–Related Protein 1–Mediated Pyk2 Phosphorylation

Elena Revuelta-López, José Castellano, Santiago Roura, Carolina Gálvez-Montón, Laura Nasarre, Sonia Benitez, Antoni Bayes-Genis, Lina Badimon, Vicenta Llorente-Cortés

Objective—Hypoxia disturbs vascular function by promoting extracellular matrix remodeling. Extracellular matrix integrity and composition are modulated by metalloproteinases (MMPs). Our aim was to investigate the role of low-density lipoprotein receptor–related protein 1 (LRP1) in regulating MMP-9/MMP-2 activation and vascular smooth muscle cells (VSMCs) migration in response to hypoxia, and to elucidate the LRP1–signaling pathways involved in this process.

Approach and Results—Western blot analysis showed that hypoxia induced a sustained phosphorylation of proline-rich tyrosine kinase 2 concomitantly with LRP1 overexpression in human VSMCs (hVSMCs). Deletion of LRP1 using small-interfering RNA technology or treatment of hVSMCs with the Src family kinase inhibitor PP2 impaired hypoxia-induced phosphorylation of proline-rich tyrosine kinase 2 levels. Coimmunoprecipitation experiments showed that the higher amounts of phosphorylation of proline-rich tyrosine kinase 2/LRP1 β immunoprecipitates in hypoxic hVSMCs were abolished in PP2-treated hVSMCs. Both LRP1 silencing and PP2 treatment were highly effective in the prevention of hypoxia-induced MMP-9 activation and hVSMC migration. Cellular subfractionation experiments revealed that PP2 effects may be caused by impairment of hypoxia-induced nuclear factor- κ B translocation to the nucleus. ELISA measurements showed that LRP1 silencing but not PP2 treatment increased interleukin-1 β , interleukin-6, and monocyte chemoattractant protein-1 secretion by hypoxic hVSMCs.

Conclusions—Our findings determine a crucial role of LRP1-mediated Pyk2 phosphorylation on hypoxia-induced MMP-9 activation and hVSMC migration and therefore in hypoxia-induced vascular remodeling. Both LRP1 silencing and PP2 treatments also influence hypoxia-induced proinflammatory effects in hVSMCs. Therefore, further studies are required to establish therapeutical strategies that efficiently modulate vascular remodeling and inflammation associated with hypoxia-vascular diseases. (*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33:2877–2887.)

Key Words: hypoxia ■ LRP1 protein, human ■ matrix metalloproteinase 1 ■ protein tyrosine kinase Pyk2

Hypoxia-associated diseases include atherosclerosis,¹ aneurysms,^{2,3} and chronic obstructive pulmonary disease (COPD).⁴ These diseases share pathophysiological mechanisms related to hypoxia-induced vascular extracellular matrix remodeling.

Metalloproteinases (MMPs) are key players in vascular remodeling, cleaving extracellular matrix components. Overexpression and activation of MMPs strongly correlates with clinical manifestations of atherosclerosis^{5,6} and with the high prevalence of abdominal aortic aneurysms⁷ and COPD.⁸ Both MMP-9 expression^{9,10} and its extracellular levels¹¹ may be regulated by low-density lipoprotein receptor–related protein 1 (LRP1). The consequences of altered expression of LRP1 for MMP-9 expression and activity, however, are controversial.

On the one hand, LRP1 deficiency causes MMP-9 overexpression in macrophages,¹² whereas on the other hand, LRP1 is involved in the upregulatory effect of tPA and other mediators involved in MMP-9 upregulation.¹³ Therefore, it is crucial to know the intracellular signal pathways connecting LRP1 and MMPs in the vascular wall.

Our group has previously demonstrated that, in vascular cells, LRP1 is upregulated by cardiovascular risk factors such as hypercholesterolemia¹⁴ and hypertension.¹⁵ Recently, we have also shown that hypoxia drives LRP1 upregulation through hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α in both human vascular smooth muscle cells (hVSMCs)¹⁶ and HL-1 cells.¹⁷

The LRP1 β chain can be phosphorylated by both serin/threonin and tyrosine kinases, and this process is crucial for

Received on: May 16, 2013; final version accepted on: September 16, 2013.

From the Cardiovascular Research Center, CSIC-ICCC, IIB-Sant Pau, Barcelona, Spain (E.R.-L., J.C., L.N., L.B.); ICREC Research Program, Fundació Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol (IGTP), Badalona, Spain (S.R., C.G.-M., A.B.-G.); and Cardiovascular Biochemistry Group, Biomedical Research Institute Sant Pau, IIB-Sant Pau, Barcelona, Spain (S.B.).

The online-only Data Supplement is available with this article at <http://atvb.ahajournals.org/lookup/suppl/doi:10.1161/ATVBAHA.113.302323/-DC1>. Correspondence to Llorente-Cortés Vicenta, Cardiovascular Research Center, CSIC-ICCC, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Sant Antoni M^o Claret, 167, 08025 Barcelona, Spain. E-mail cllorente@csic-iccc.org

© 2013 American Heart Association, Inc.

Arterioscler Thromb Vasc Biol is available at <http://atvb.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/ATVBAHA.113.302323

2877

Nonstandard Abbreviations and Acronyms	
COPD	chronic obstructive pulmonary disease
ERK1,2	extracellular signal–regulated kinase 1/2
HMDM	human monocyte–derived macrophage
hVSMC	human vascular smooth muscle cell
LRP1	low-density lipoprotein receptor–related protein 1
MMP	metalloproteinases
Pyk2	proline-rich tyrosine kinase 2

LRP1 signal transduction.^{18–20} LRP1 modulates the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal–regulated kinase (ERK) cascade^{21–23} and signal transduction pathways initiated by platelet-derived growth factor receptor.^{24,25} Binding of LRP1 to ligands such as α_2 M/apoE in neurons²⁶ or defensins in VSMCs from human coronary arteries²⁷ regulates intracellular calcium signaling. By increasing intracellular calcium levels, hypoxia reportedly alters proline-rich tyrosine kinase 2 (Pyk2) phosphorylation.²⁸ Pyk2 has been involved in several physiological processes, including cell growth, differentiation, metabolism, and cytoskeleton function.²⁹ However, the role of Pyk2 on MMP expression and activation remains unresolved.

We hypothesized that LRP1 could participate in MMP expression and activation by modulating hypoxia-induced Pyk2 phosphorylation. The aim of this work was to describe the effect of hypoxia on Pyk2 phosphorylation driving MMP activation and determine the role of LRP1 in this process in hVSMCs.

Methods

An expanded Methods section is available in the online-only Supplement. Cell culture of hVSMCs, mouse VSMCs (mVSMCs), and human monocyte–derived macrophages (HMDMs), small-interfering RNA (siRNA) gene silencing, isolation of nuclear and cytosolic extracts, Western blot, real-time polymerase chain reaction, zymographic analyses, immunoprecipitation, indirect immunofluorescence, reactive oxygen species (ROS) measurements, ELISAs, immunohistochemistry, and wound repair assays experiments were performed.

Results

Effect of Hypoxia in Intracellular Signaling in hVSMCs, mVSMCs, and HMDMs

Western blot analysis showed that hypoxia induced a sustained phosphorylation of Pyk2 from 4 to 32 hours (Figure 1A and 1C) concomitantly with LRP1 protein upregulation (Figure 1A and 1B) in hVSMCs. In contrast, both LRP1 protein (Figure 1A and 1B in the online-only Data Supplement) and Pyk2 phosphorylation (Figure 1A and 1C in the online-only Data Supplement) levels were significantly decreased at 16 and 32 hours of mVSMCs exposure to hypoxia. Total Pyk2 was not significantly altered by hypoxia either in hVSMCs (Figure 1A) or in mVSMCs (Figure 1A in the online-only Data Supplement). ERK1,2 phosphorylation was upregulated by hypoxia in both hVSMCs and mVSMCs. However, in hVSMCs, the hypoxia-induced ERK1,2 phosphorylation was transient (Figure 1A and 1D), whereas it was more sustained in mVSMCs (Figure 1A and 1D in the online-only Data Supplement). Total ERK1,2 protein levels were not affected

by hypoxia either in hVSMCs or mVSMCs (Figure 1A; Figure 1A in the online-only Data Supplement). Similar to mVSMCs, hypoxia (16 and 32 hours) exerted a downregulatory effect on both LRP1 (Figure 1A and 1B in the online-only Data Supplement) and phosphorylation of pPyk2 (Figure 1A and 1C in the online-only Data Supplement) levels in HMDMs. However, in contrast to mVSMCs, hypoxia also downregulated ERK1,2 phosphorylation in HMDMs (Figure 1A and 1D in the online-only Data Supplement). Total Pyk2 and total ERK1,2 were not altered by hypoxia in these cells (Figure 1A in the online-only Data Supplement). Indirect immunofluorescence experiments showed similar total Pyk2 staining in normoxic and hypoxic hVSMCs (Figure 1E). Hypoxia, however, strongly increased pPyk2 staining in hVSMCs (Figure 1E). As previously shown in hVSMCs,¹⁶ HIF-1 α levels were significantly increased at 4 and 8 hours of mVSMCs (Figure 1E in the online-only Data Supplement) and HMDMs (Figure 1E in the online-only Data Supplement) exposure to hypoxia. Sterol regulatory element binding proteins-2 mRNA expression in mVSMCs, like in hVSMCs,¹⁶ was significantly reduced by hypoxia (Figure 1F in the online-only Data Supplement). In contrast, sterol regulatory element binding proteins-1 but not sterol regulatory element binding proteins-2 mRNA was significantly reduced by hypoxia in HMDMs (Figure 1F in the online-only Data Supplement).

Effect of Hypoxia on MMP Expression and Activity in hVSMCs, mVSMCs, and HMDMs

Quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction analysis showed that hypoxia specifically upregulated MMP-9 mRNA (Figure 1I in the online-only Data Supplement) but not MMP-2 mRNA levels in hVSMCs (Figure 1I in the online-only Data Supplement). Accordingly, zymography analysis showed an increase in MMP-9 but not in MMP-2 activity in hypoxic hVSMCs (Figure 1J in the online-only Data Supplement). In contrast to the upregulatory effect of hypoxia on both MMP-9 expression and activity in hVSMCs, MMP-9 (Figure 1J in the online-only Data Supplement) and MMP-2 (Figure 1J in the online-only Data Supplement) mRNA expression, and MMP-9/MMP-2 activities (Figure 1J in the online-only Data Supplement) were downregulated in hypoxic mVSMCs. As in mVSMCs, MMP-9 mRNA (Figure 1J in the online-only Data Supplement) and MMP-9 activity (Figure 1J in the online-only Data Supplement) were strongly downregulated in HMDMs exposed to hypoxia for 16 and 32 hours. However, MMP-2 mRNA (Figure 1J in the online-only Data Supplement) and MMP-2 activity (Figure 1J in the online-only Data Supplement) were unaltered by hypoxia in HMDMs.

Impact of LRP1 Deficiency on Hypoxia-Induced hVSMC Migration and hVSMC Proinflammatory Phenotype

To assess the involvement of LRP1 on the upregulatory effect of hypoxia on Pyk2 phosphorylation, we inhibited LRP1 expression by siRNA technology. First, we corroborated that transduction with siRNA-LRP1 inhibited LRP1 protein levels in hVSMCs (Figure 2A and 2B). As shown

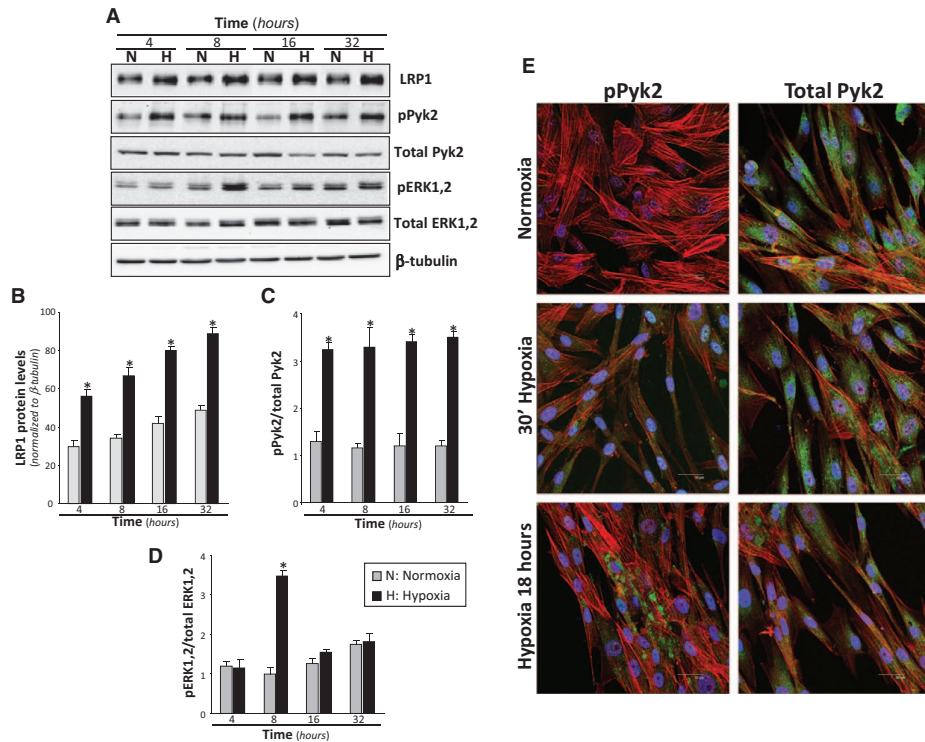


Figure 1. Time-course of hypoxia-induced proline-rich tyrosine kinase 2 (Pyk2) and extracellular signal-regulated kinase (ERK)1,2 phosphorylation in human vascular smooth muscle cells (hVSMCs). hVSMCs were exposed to either normoxia or hypoxia for 4, 8, 16, and 32 h. **A**, Representative Western blot analysis showing low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1), pPyk2, total Pyk2, pERK1,2, total ERK1,2 bands. β -tubulin was detected as loading control. Bar graphs show quantification of LRP1 (**B**), pPyk2/total Pyk2 ratio (**C**), and pERK1,2/total ERK1,2 (**D**) in normoxic (gray bars) and hypoxic (black bars) conditions. Results are expressed as mean \pm SEM of 2 independent experiments performed in triplicate. * P <0.05 vs normoxic cells. **E**, Confocal laser microscopy images showing total and pPyk2 staining of cultured hVSMCs under normoxic or hypoxic conditions for 30 min and 18 h. Cells were washed, fixed, permeated, and incubated with anti-Pyk2 antibodies (green), nuclei (blue), and actin fibers (in red). Scale bar, 50 μ m/L. H indicates hypoxia; and N, normoxia.

in Figure 2A and 2C, hypoxia strongly increased pPyk2/total Pyk2 ratio in control and siRNA-random treated hVSMCs. On the contrary, hypoxia failed to significantly increase pPyk2/total Pyk2 ratio in LRP1-deficient hVSMCs. Moreover, siRNA-LRP1 did not exert any significant effect on upregulatory effect of hypoxia on pERK1,2/total ERK1,2 ratio in these cells (Figure 2A and 2D). pSrc/total Src ratio was not significantly altered by hypoxia or siRNA-LRP1 treatment (Figure 2A and 2E).

Next, we analyzed the involvement of LRP1 on the upregulatory effect of hypoxia on MMP-9 expression and activation using hVSMCs transfected with siRNA-LRP1. MMP-9 activation induced by hypoxia in both control and siRNA-random-transfected cells was completely prevented in siRNA-LRP1-transfected hVSMCs (Figure 3A). In contrast, MMP-2 activity remained unchanged in hypoxic and siRNA-LRP1-treated hVSMCs (Figure 3A). The effect of hypoxia on wound repair and VSMC migration using an in vitro scrape-injury model was also analyzed. As shown in Figure 3B,

hypoxic hVSMCs showed a significant higher percentage of recovered area than normoxic hVSMCs. Both siRNA-LRP1 and siRNA-MMP-9 treatments strongly impaired hypoxia-induced hVSMC migration.

To know whether oxidative stress plays a role in the induction of MMP-9 activity, we measured ROS levels. As shown in Figure 3C, ROS levels were significantly increased by treatment of hVSMCs with H₂O₂ (positive control), and hypoxia equally increased ROS levels in control, siRNA-random, and siRNA-LRP1-hVSMCs. ELISA measurements (Figure 3D) indicated that both interleukin (IL)-1 β and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) were slightly but significantly increased in supernatants from siRNA-LRP1-treated hVSMCs compared with siRNA-random or control hVSMCs exposed to hypoxic conditions. siRNA-LRP1 treatment, per se, significantly increased IL-6 secretion, and hypoxia exacerbated the effect of siRNA-LRP1. IL-10 secretion was significantly reduced by hypoxia in all tested conditions. Real-time polymerase chain reaction experiments

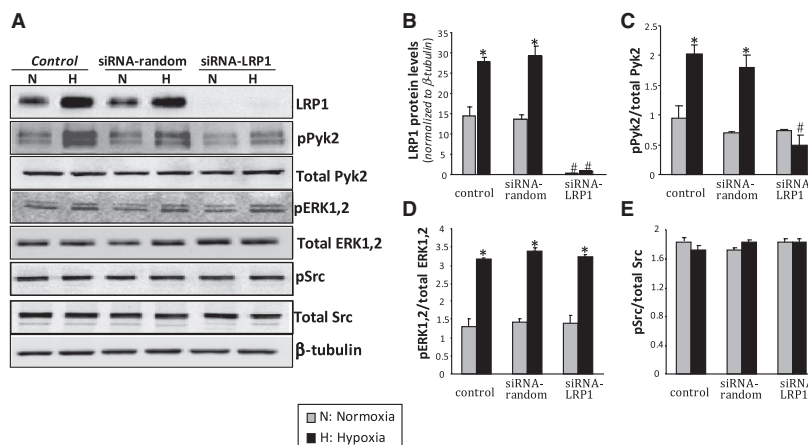


Figure 2. Effect of specific abrogation of low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) on proline-rich tyrosine kinase 2 (Pyk2) and extracellular signal-regulated kinase (ERK)1,2 phosphorylation induced by hypoxia. Quiescent human vascular smooth muscle cells (VSMCs) were transfected with small-interfering RNA (siRNA)-LRP1 or siRNA-random (0.6 μmol/L) by nucleofection. Control cells were nucleofected in the absence of siRNA. VSMCs were exposed to normoxia or hypoxia and harvested at 18 h to test LRP1, pPyk2, total Pyk2, pERK1,2, total ERK1,2, pSrc, and total Src protein levels. Representative Western blot analysis (A) and bar graphs showing the quantification of LRP1 (B), pPyk2/total Pyk2 (C), pERK1,2/total ERK1,2 (D), and pSrc/total Src (E) protein bands. β-tubulin was detected as loading control. Results are expressed as mean±SEM of 2 experiments performed in triplicate. **P*<0.05 vs normoxic controls, #*P*<0.05 vs control or siRNA-random VSMCs. H indicates hypoxia; and N, normoxia.

(Figure IV in the online-only Data Supplement) showed that hypoxia significantly increased IL-1β and IL-6 mRNA expression, and that siRNA-LRP1 increased IL-1β, MCP-1, and IL-6 mRNA expressions in hVSMCs. Interestingly, IL-6 mRNA expression was synergistically induced by hypoxia and siRNA-LRP1 treatment in hVSMCs.

Impact of PP2 Treatment on Hypoxia-Induced hVSMC Migration and hVSMC Proinflammatory Phenotype

Exposure to PP2 completely and specifically prevented hypoxia-induced Pyk2 phosphorylation (Figure 4A). PP2 also decreased ERK1,2 phosphorylation by ≈40% in hVSMCs (Figure 4A). As expected, U0126, a highly selective inhibitor of both ERK1 and ERK2 phosphorylation, almost completely blocked ERK1,2 phosphorylation without altering Pyk2 phosphorylation in hVSMCs (Figure 4A). Additionally, PP2 completely blocked hypoxia-induced MMP-9 activation in hVSMCs (Figure 4B). In contrast, U0126 only exerted a slight effect on MMP-9 activation in hVSMCs (Figure 4B). Wound repair experiments performed using an in vitro scrape-injury model showed that hypoxic hVSMCs had higher percentage of recovered area than normoxic hVSMCs. PP2 strongly impaired migration of both normoxic and hypoxic hVSMCs (Figure 4C). Although to a lesser extent, U0126 also moderately decreased human normoxic and hypoxic hVSMC migration. The percentage of recovered area in hypoxic hVSMC was similar to that seen in normoxic hVSMC, and it was reduced by ≈25% in the presence of U0126 (Figure V in the online-only Data Supplement).

Cellular subfractionation experiments showed that hypoxia significantly activated nuclear factor-κβ (NF-κβ) signaling

in hVSMCs promoting a decrease in the cytosolic levels of I kappa B kinase (Iκβα) (Figure 4D) that parallels the translocation of P-p65 from the cytosol to the nucleus. This effect was completely prevented in PP2-treated hVSMCs (Figure 4D).

ELISA measurements showed that PP2 did not significantly alter the secretion of IL-1β, IL-6, or MCP-1 in hVSMCs exposed to normoxic or hypoxic conditions. However, PP2 significantly prevented the downregulatory effect of hypoxia on IL-10 secretion in hVSMCs (Figure 4E). Real-time polymerase chain reaction experiments showed that PP2 strongly induced IL-1β, MCP-1, and IL-6 mRNA expressions in hVSMCs exposed to normoxic or hypoxic conditions (Table IV in the online-only Data Supplement).

Response of hVSMCs to Hypoxia in the Presence of Extracellular Proatherosclerotic Stimuli

LRP1 protein levels were upregulated by angiotensin II (AngII; Figure 5A) and aggregated LDL (agLDL) (Figure 5C) in hVSMCs, as previously shown by our group.^{14,15} However, neither AngII nor agLDL further increased hypoxia-induced LRP1 in hVSMCs. pPyk2/total Pyk2 ratio was induced by AngII (Figure 5A) but not by agLDL (Figure 5C). MMP-9 activity was induced by AngII (Figure 5B) but reduced by agLDL (Figure 5D) either under normoxic or under hypoxic conditions.

To know whether hypoxic stimulus was dependent on hVSMC origin, we compared the effect of hypoxia on LRP1 and pPyk2/total Pyk2 ratio in normal and plaque-hVSMCs obtained from the same coronary artery. In agreement with previous results,³⁰ LRP1 protein levels were significantly higher in plaque-hVSMCs than in normal hVSMCs (Figure 5E). Hypoxia upregulated LRP1 protein in both normal and plaque-hVSMCs, although to a higher extent in normal hVSMCs.

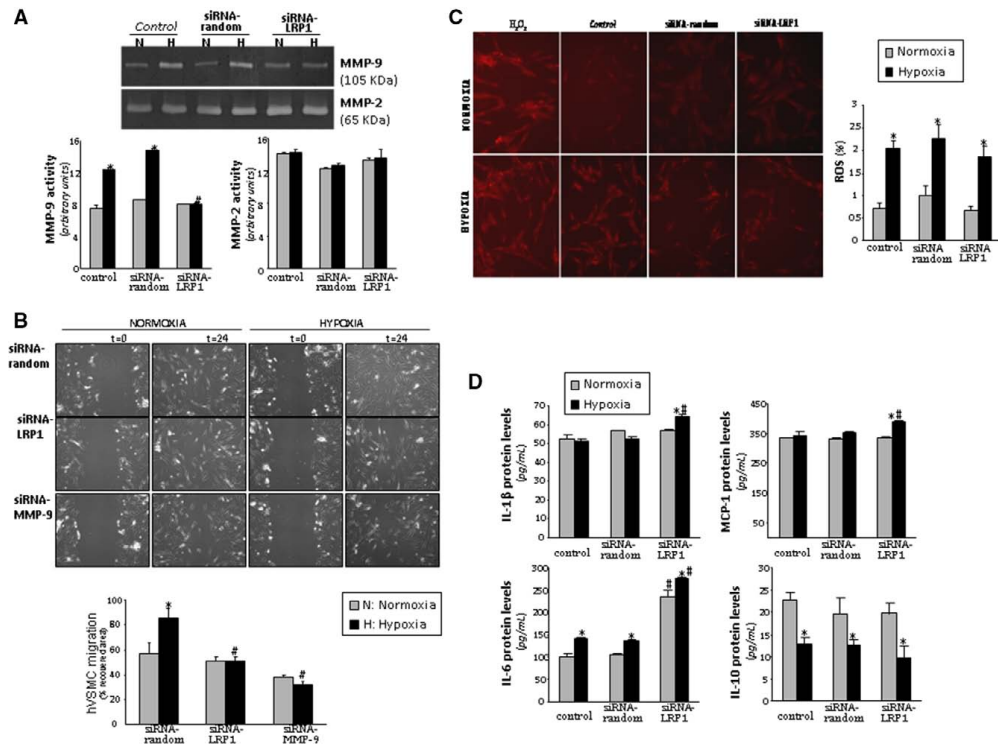


Figure 3. Effect of low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) inhibition on hypoxia-induced metalloproteinase (MMP)-9 activation, human vascular smooth muscle cell (hVSMC) migration, reactive oxygen species (ROS) and cytokine secretion in hVSMCs. Quiescent hVSMCs were transfected with small-interfering RNA (siRNA)-LRP1 or siRNA-random (0.6 μmol/L) by nucleofection. Control cells were nucleofected in absence of siRNA. VSMCs were harvested at 18 h to test MMP-9 and MMP-2 activity. **A**, Representative zymography analysis showing MMP-9 and MMP-2 activities from conditioned media derived from control, siRNA-random, and siRNA-LRP1-treated hVSMCs and bar graphs showing the quantification of MMP-9 and MMP-2 bands. **B**, Phase-contrast microscopy images showing the migratory capacity of siRNA-random, siRNA-LRP1, and siRNA-MMP-9-treated hVSMCs in normoxia and hypoxia. Bar graphs show the quantification of cell migration rate over time. **C**, Fluorescence microscopy images showing ROS levels and bar graphs with the quantification of fluorescence. **D**, Bar graphs showing extracellular cytokine levels measured by ELISA. Results were expressed as mean±SEM of 2 experiments performed in triplicate. **P*<0.05 vs normoxic controls, #*P*<0.05 vs control or siRNA-random VSMC. H indicates hypoxia; IL, interleukin; and N, normoxia.

pPyk2/Pyk2 ratio was upregulated by ≈3-fold independently on the origin of hVSMC (Figure 5E). MMP-9 activity was induced by hypoxia in both plaque- and normal hVSMCs, although the induction was higher in normal hVSMCs (Figure 5F).

Effect of Hypoxia on the Physical Interaction Between LRP1β Chain and pPyk2 and in hVSMCs

Immunoprecipitation experiments with anti-LRP1β chain antibodies showed that pPyk2 physically interacts with LRP1β chain. LRP1 immunoprecipitates from hVSMC exposed to normoxia or hypoxia (18 hours) in absence or presence of PP2 (50 μmol/L) were analyzed by Western blot using anti-pPyk2 antibodies. As shown in Figure 6A, hypoxia increased the amount of pPyk2 bound to the LRP1β chain, and this increase was prevented by the Src family kinase inhibitor PP2. Reverse experiments (immunoprecipitation by anti-pPyk2 antibody followed by immunoblotting with anti-LRP1β antibody) led to similar results.

Analysis of LRP1β Chain, pPyk2, and MMP-9 Staining in HIF-1α Positive Areas of the Human Vasculature

Figure VI in the online-only Data Supplement shows a representative Masson Trichrome staining of an atherosclerotic plaque and a normal area used as a control. HIF-1α, LRP1, pPyk2, and MMP-9 markers were highly expressed in deeper areas of the intima where cells were positive for α-actin (specific VSMC marker) in human atherosclerotic plaques. In contrast, a slight LRP1, pPyk2, MMP-9, and HIF-1α staining was observed in α-actin positive control areas. Image analysis quantification (Figure VI in the online-only Data Supplement) showed a significant increase in intimal HIF-1α (Figure VIa in the online-only Data Supplement), LRP1 (Figure VIb in the online-only Data Supplement), pPyk2 (Figure VIc in the online-only Data Supplement), and MMP-9 (Figure VIe in the online-only Data Supplement) in atherosclerotic compared with control vessels. Indirect

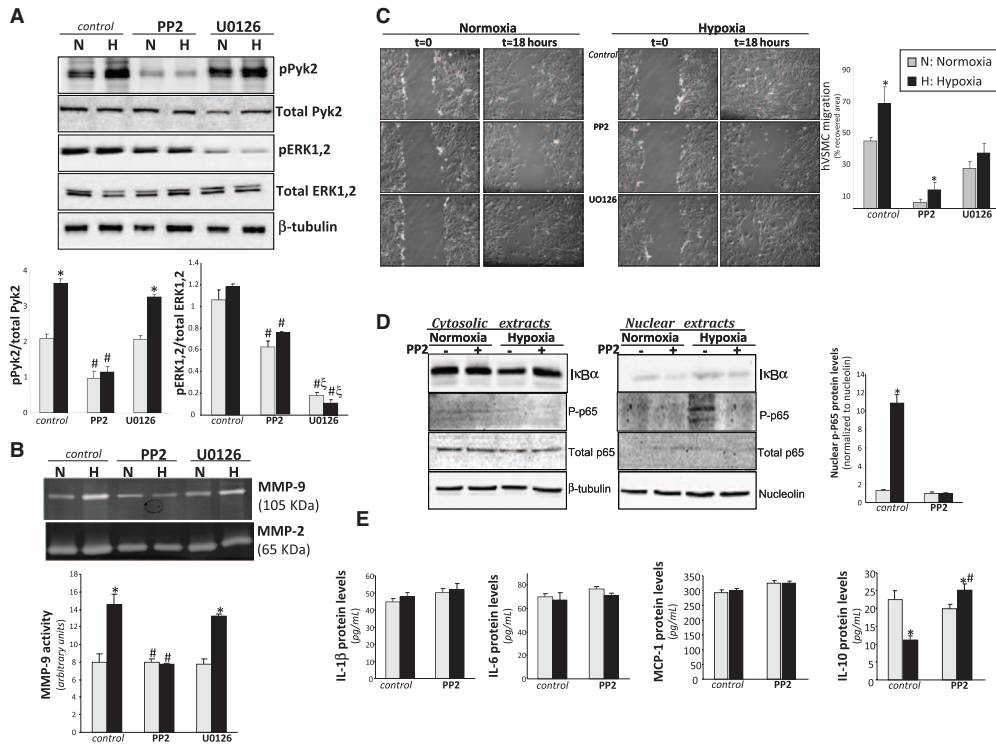


Figure 4. Effect of PP2 on hypoxia-induced metalloproteinase (MMP)-9 activation, human vascular smooth muscle cell (hVSMC) migration, reactive oxygen species, and cytokine secretion in hVSMCs. Quiescent hVSMCs were untreated or treated with PP2 (50 μ mol/L) or U0126 (10 μ mol/L) for 18 h in normoxic or hypoxic conditions. **A**, Representative Western blot analysis showing low-density lipoprotein receptor-related protein 1, pPyk2, total Pyk2, pERK1,2, and total ERK1,2. Bar graphs represent quantification of pPyk2/total Pyk2 and pERK1,2/total ERK1,2 ratios. β -tubulin was also detected as loading control. **B**, Representative zymography analysis showing MMP-9 and MMP-2 activities from conditioned media derived from control, PP2, and U0126-treated hVSMCs and bar graphs showing the quantification of MMP-9 and MMP-2 bands. **C**, Phase-contrast microscopy images showing the migratory capacity of control, PP2-treated hVSMCs, and U0126-treated hVSMCs in normoxia and hypoxia and bar graphs show quantification of cell migration rate over time. Data from 2 independent experiments performed in triplicate are expressed as mean \pm SEM. **D**, hVSMCs were treated with PP2 (50 μ mol/L; 4 h) in normoxia or hypoxia. Representative Western blot analysis of cytosolic and nuclear extracts using specific antibodies against I kappa B kinase and p-P65. β -tubulin and nucleolin were used as loading controls for cytosolic and nuclear extracts, respectively. **E**, Bar graphs showing extracellular cytokine levels measured by ELISA. Results from 2 experiments performed in triplicate are expressed as mean \pm SEM. * P <0.05 vs normoxic cells, # P <0.05 vs control; ξ vs PP2-treated cells. ERK indicates extracellular signal-regulated kinase; IL, interleukin; and Pyk2, proline-rich tyrosine kinase 2.

immunofluorescence experiments showed that the specific fluorescence for pPyk2 and MMP-9 overlapped in vascular cells of atherosclerotic plaques.

Discussion

Our results show that hypoxia upregulates pPyk2 protein levels in an LRP1-dependent manner, and that the upregulatory effect of hypoxia on the LRP1-pPyk2 axis determines MMP-9 activation and hVSMC migration. Thus, we propose that LRP1-pPyk2 axis may be a crucial player in the modulation of vascular extracellular matrix remodeling associated with human hypoxic vascular-related diseases.

Previous studies from our group showed that hypoxia strongly upregulated LRP1 expression in hVSMCs.¹⁶ Here, we show that LRP1 expression and Pyk2 phosphorylation

were concomitantly upregulated by hypoxia for ≤ 32 hours in hVSMCs. According to our results, hypoxia modulates LRP1 and pPyk2 levels in a specific manner depending on species and cell type. The modulation of LRP1/pPyk2 levels by hypoxia was positive in hVSMCs but negative in mVSMCs and HMDMs. We previously showed that hypoxia-induced LRP1 overexpression is mediated by HIF-1 α in hVSMCs and HL-1 cells.^{16,17} HIF-1 α expression depends on intracellular calcium concentrations that rapidly and persistently increase in response to hypoxia.^{31,32} Hypoxia-induced Pyk2 phosphorylation has been associated to a hypoxia-induced increase in calcium cytosolic levels.^{5,33} An intracellular calcium increase may thus underlie both HIF-1 α -mediated LRP1 overexpression and Pyk2 phosphorylation induced by hypoxia in hVSMCs. It

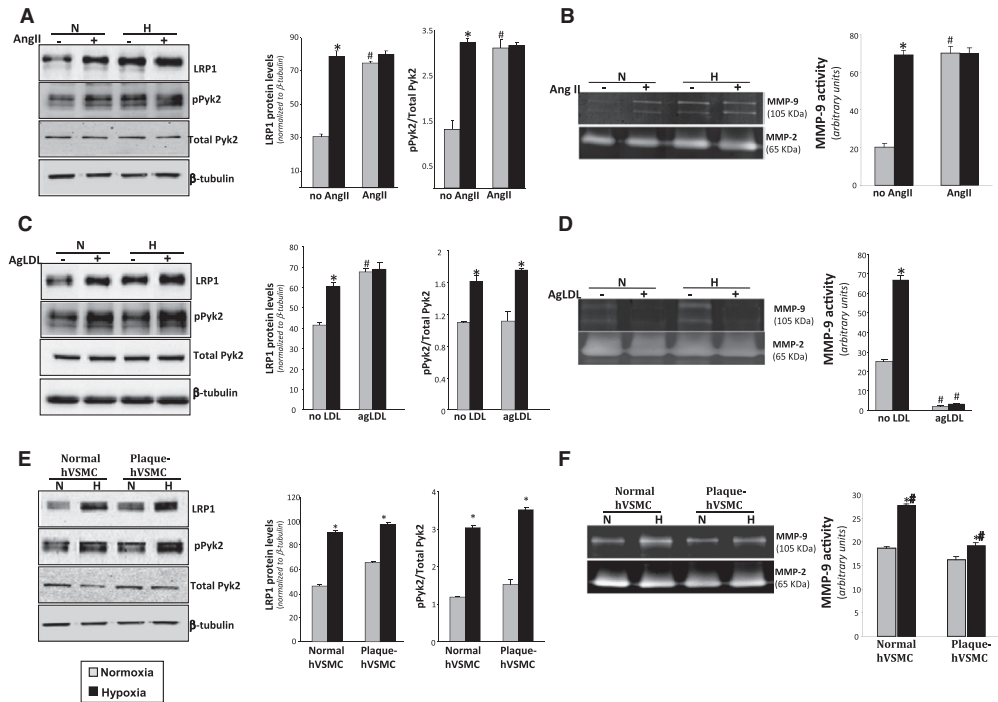


Figure 5. Effect of hypoxia on human vascular smooth muscle cells (hVSMCs) exposed to different proatherosclerotic stimuli. **A–F,** Quiescent hVSMCs were exposed to angiotensin II (AngII; 1 μ mol/L) or aggregated LDL (agLDL) (100 μ g/mL) for 18 h under normoxic or hypoxic conditions. **A and C,** Representative Western blot analysis showing low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1), pPyk2, and total Pyk2 bands and bar graphs showing the quantification of LRP1 and pPyk2/total Pyk2 ratio. β -tubulin was also detected as loading control. **B and D,** Representative zymography analysis showing metalloproteinase (MMP)-9 and MMP-2 activities from conditioned media and bar graphs showing the quantification of MMP-9 and MMP-2 bands. **E,** Representative Western blot analysis showing LRP1, pPyk2, and total Pyk2 bands and bar graphs showing the quantification of LRP1 and pPyk2/total Pyk2 ratio in normal and plaque-hVSMCs exposed to normoxic and hypoxic conditions. β -tubulin was also detected as loading control. **F,** Representative zymography analysis showing MMP-9 and MMP-2 activities from conditioned media and bar graphs showing the quantification of MMP-9 and MMP-2 bands in the extracellular medium from normal and plaque-hVSMCs exposed to normoxic and hypoxic conditions. Results from 3 experiments performed in triplicate are expressed as mean \pm SEM. * P <0.05 vs normoxic cells, # P <0.05 vs control cells (unexposed to AngII, unexposed to agLDL or normal hVSMC). LDL indicates low-density lipoprotein; and Pyk2, proline-rich tyrosine kinase 2.

remains to be elucidated why this mechanism works differently in hVSMCs than in mVSMCs and HMDMs despite HIF-1 α overaccumulates under hypoxic conditions in all tested cell types. Hypoxic stress and HIF-1 α overexpression have been related to reactive oxygen species (ROS) production.^{34,35} Moreover, there are huge evidences showing that H₂O₂ emission from mitochondria during hypoxia regulates cellular responses to hypoxia.^{36,37} In agreement with previous data, results from the present study showed that one of the phenotypic changes that hypoxia induces in hVSMC is an increased ROS production. Hypoxia-induced ROS overproduction likely contributes to Pyk2 phosphorylation because Pyk2 is activated in a ROS-dependent manner in rat heart-derived H9c2 cells,³⁸ murine macrophages,³⁹ and A10 VSMC.⁴⁰ Like hypoxia, AngII also increases Pyk2 phosphorylation in hVSMCs, as previously reported in rat thoracic aortic VSMCs.^{41,42} In contrast, agLDL did not show any significant effect on Pyk2 phosphorylation in hVSMCs.

In the present study, we have also compared the effect of hypoxia on LRP1-pPyk2 in hVSMCs from atherosclerotic plaque and from normal areas of the same vessels. In agreement with our previous studies,³⁰ LRP1 was overexpressed in hVSMCs from atherosclerotic plaques. In the present study, we showed that hypoxia activates Pyk2 phosphorylation in both normal and plaque-hVSMCs, suggesting that hypoxia may alter Pyk2 phosphorylation independently of VSMC atherosclerotic phenotype.

Our results also showed that hypoxia strongly increased MMP-9 in hVSMCs, and that VSMC could thus actively contribute to the exacerbated MMP activity associated to hypoxic areas of the vascular wall.¹ However, according to our results, hypoxia did not exert any significant effects on MMP-9 activity in the presence of agLDL. These results are in agreement with the strong capacity of agLDL to decrease MMP-9 activity and hVSMC migration previously described by our group.^{43,44} In line with these results, hypoxia induced

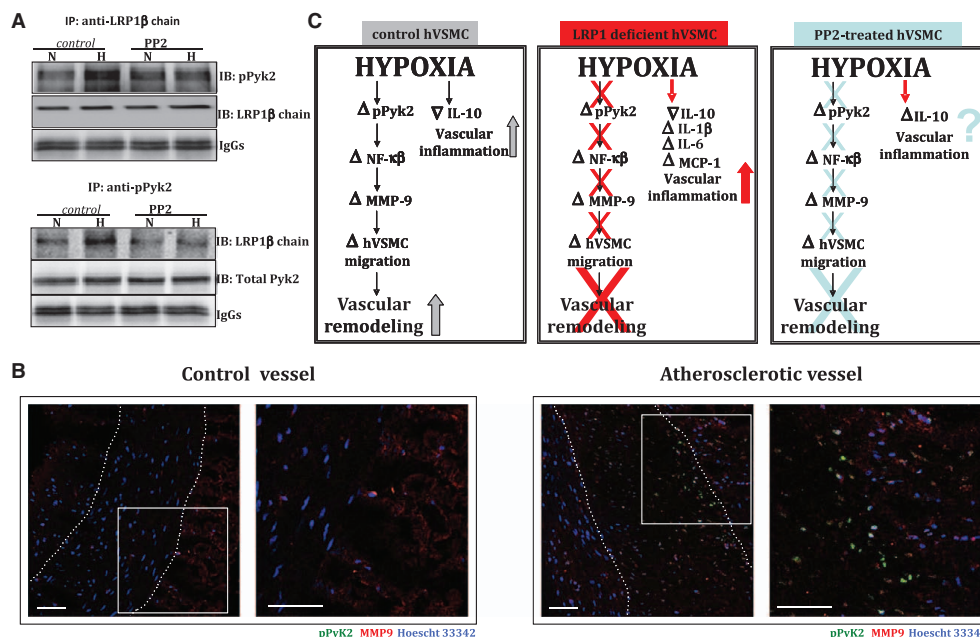


Figure 6. Analysis of pPyk2 levels in low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) β chain immunoprecipitates from hypoxic human vascular smooth muscle cell (hVSMC) and in atherosclerotic vessels. **A**, Protein extracts from normoxic and hypoxic hVSMC untreated or treated with PP2 (50 μ mol/L; 18 h) were applied on LRP1 β chain-affinity beads. One fraction of protein extract from each sample was applied to mock (-) beads as negative control. LRP1 β immunoprecipitates were analyzed using the antiPyk2 antibodies. Immunoblots were finally reprobated against LRP1. The reverse experiment (immunoprecipitation [IP]: antiPyk2; immunoblotting: anti-LRP1 β chain) was also performed. **B**, Representative images showing specific detection of pPyk2 (green), metalloproteinases (MMP)-9 (red), and cell nuclei (blue) in a control and atherosclerotic vessels by indirect immunofluorescence. Scale bar, 50 μ mol/L. **C**, Representative scheme comparing hypoxia-induced alterations in control, small-interfering RNA (siRNA)-LRP1- and PP2-treated hVSMCs. IL indicates interleukin; NF- κ B, nuclear factor- κ B; and Pyk2, proline-rich tyrosine kinase 2.

MMP-9 activity to a lower extent in plaque-VSMCs, cell with high capacity to take up agLDL³⁰ than in normal VSMCs. These results suggest that lipids in advanced atherosclerotic plaques may counteract hypoxia-induced MMP-9 activation and hVSMC migration, favoring the fibrous cap weakness and plaque rupture.

In the present study, hypoxia fails to induce Pyk2 phosphorylation in LRP1-deficient hVSMC, suggesting that LRP1 is essential for hypoxia-induced Pyk2 phosphorylation. Thus, LRP1 may contribute to the sustained increase in intracellular calcium required for Pyk2 phosphorylation, probably because of the capacity of LRP1 to retain calcium in its fifth and sixth CR-domain (CR56).⁴⁵ Moreover, our results showed that hypoxia-induced LRP1 overexpression is linked to Pyk2 phosphorylation and MMP-9 activation in hVSMC. In accordance, LRP1 deficiency prevented hypoxia-induced MMP-9 overexpression, and that both LRP1 and MMP-9 silencing delayed hypoxia-induced hVSMC migration. Data from ROS and cytokine measurements showed that LRP1 deficiency did not alter ROS production but favored higher expression and release of proinflammatory cytokines such as IL-1 β , IL-6, and MCP-1 in hypoxic hVSMCs. In contrast, LRP1 deficiency

did not show further effects on the downregulatory effect of hypoxia on the secretion of the anti-inflammatory IL-10 cytokine. Our results in hVSMCs are in agreement with previous results obtained in LRP1-deficient macrophages, where high amounts of IL-1 β , IL-6, and MCP-1 mRNA levels have been reported.¹² Therefore, under hypoxic conditions, LRP1-deficient hVSMCs show lower migratory but higher proinflammatory capacity than control hVSMCs. Like siRNA-LRP1, we found that PP2 treatment strongly inhibited hypoxia-induced Pyk2 phosphorylation, MMP-9 activation, and hVSMC migration. PP2 treatment also partially inhibited ERK1,2 phosphorylation in hVSMCs, as previously reported in other cell types.⁴⁶⁻⁴⁸ Taken together, our findings revealed that hypoxia-induced MMP-9 activation in hVSMCs largely depends on LRP1-pPyk2 axis and to a lesser extent on ERK1,2 phosphorylation (LRP1 independent and pPyk2-partially dependent). During hypoxia, MMP-9 activation or inactivation is cell-type specific and apparently depends, respectively, on the upregulatory or downregulatory effects of hypoxia on LRP1-pPyk2 levels. Our results contribute to explain the controversial findings in the literature concerning the effect of hypoxia on MMP-9 levels. MMP-9 production was shown to be downregulated

by hypoxia in human monocyte-derived dendritic cells⁴⁹ but upregulated in both tumoral⁵⁰ and cardiac muscle cells.⁵¹

Both Pyk2 phosphorylation⁵² and ROS⁵³ may underlie the ability of hypoxia to activate NF- κ B. Our results showed that, in hVSMCs, PP2 completely blocked hypoxia-induced NF- κ B activation, a transcription factor involved in MMP-9 promoter upregulation.⁵⁴ Results from the present study show that hypoxia-induced pPyk2-NF- κ B activation is a key in MMP-9 activation in hVSMCs. This activation could contribute to explain the pivotal role of NF- κ B in the pathogenesis of aneurysms.⁵⁴ In agreement with MMP-9 modulation, PP2 almost completely prevented hypoxia-induced hVSMC migration. Despite the negative effect of hypoxia on MMP-9 expression/activity in mVSMCs, hypoxia did not reduce the migratory capacity of normoxic mVSMCs, which was significantly decreased by inhibition of ERK1,2 phosphorylation. These results suggest that ERK1,2 phosphorylation may modulate mVSMC migration in an MMP-9-independent manner.

Differently to siRNA-LRP1, PP2 treatment of hVSMCs did not increase IL-1 β , MCP-1, or IL-6 secretion and prevented the reduction in IL-10 secretion caused by hypoxia. Surprisingly, PP2 dramatically increase IL-1 β , MCP-1, or IL-6 mRNA expression in hVSMCs. These results suggest that PP2 may differentially influence cytokine synthesis and secretion. It has been previously reported that PP2 influence the production of microRNAs,⁵⁵ and that microRNAs⁵⁶ may influence not only the expression but also the secretion of cytokines. Further studies are indeed required to know the effects of PP2 on cytokine expression and secretion by hVSMCs.

In summary, our results show that LRP1-pPyk2-NF- κ B axis is essential for the upregulatory effect of hypoxia on MMP-9 activation and hVSMC migration. Active synthesis of MMP-9 determines the stability of atherosclerotic plaque^{5,6} and the prevalence of abdominal aortic aneurysms⁷ and COPD.⁸ Thus, we can speculate that MMP-9 activation in hypoxia-associated human vascular diseases is targeted through LRP1 modulation.

Clinical Implications

Hypoxia is a pathophysiological condition associated with vascular diseases such as atherosclerosis, aneurysms, or COPD. Our results suggest that the hypoxic induction of MMP-9 activity and its consequences in vascular remodeling may have higher impact in the vascular wall when modified lipids are not yet present such as aneurysms, COPD, or in very early stages of atherosclerosis, where VSMC proliferation and migration are crucial events. Besides vascular remodeling, inflammation also underlies the pathological effects of hypoxia. The main results from the present study are summarized in Figure 6C. On the one hand, hypoxia, by inducing LRP1-pPyk2-NF- κ B axis promotes MMP-9 activation and hVSMC migration with associated effects on vascular remodeling. On the other hand, hypoxia favors a proinflammatory phenotype of hVSMCs (Figure 6C, left). LRP1 inhibition attenuates hypoxia-induced MMP-9 activation and hVSMC migration, and therefore LRP1 silencing may potentially prevent hypoxia-induced vascular remodeling. However, LRP1 silencing strongly promotes a proinflammatory phenotype in hypoxic hVSMC by inducing the secretion of IL-1 β , IL-6,

and MCP-1 (Figure 6C, middle). PP2 treatment exerts similar effects on hypoxia-induced MMP-9 activation and hVSMC migration than LRP1 silencing. PP2 did not induce IL-1 β , IL-6, and MCP-1 secretion and prevents hypoxia-induced IL-10 reduction (Figure 6C, right). However, the differential effects of PP2 on cytokine expression and secretion and the complex interplay between cytokines make it difficult to extrapolate the results from in vitro to in vivo models. We propose that PP2 may be a potential therapeutic tool in the prevention of remodeling and inflammation in hypoxia-vascular diseases. However, further studies in hVSMC-ressembled hypoxia in vivo models are indeed required to analyze whether PP2 may counteract hypoxia-associated vascular remodeling without increasing inflammation.

Acknowledgments

We thank the Heart Transplant Team at the Cardiology and Cardiac Surgery Service at Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.

Sources of Funding

This work was funded by Fondo Investigación Sanitaria PI11/00747 from Instituto Salud Carlos III, and cofinanced by the European Fund for Regional Development and by Red de Investigación Cardiovascular (RD RD12/0042/0027 and RD12/0042/0047).

Dislosures

None.

References

- Libby P, Folco E. Tension in the plaque: hypoxia modulates metabolism in atheroma. *Circ Res*. 2011;109:1100–1102.
- Erdozain OJ, Pegrum S, Winrow VR, Horrocks M, Stevens CR. Hypoxia in abdominal aortic aneurysm supports a role for HIF-1 α and Ets-1 as drivers of matrix metalloproteinase upregulation in human aortic smooth muscle cells. *J Vasc Res*. 2011;48:163–170.
- Naito R, Sakakura K, Kasai T, Dohi T, Wada H, Sugawara Y, Kubo N, Yamashita S, Narui K, Ishiwata S, Ohno M, Ako J, Momomura S. Aortic dissection is associated with intermittent hypoxia and re-oxygenation. *Heart Vessels*. 2012;27:265–270.
- Voelkel NF, Mizuno S, Bogaard HJ. The role of hypoxia in pulmonary vascular diseases: a perspective. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2013;304:L457–L465.
- Gough PJ, Gomez IG, Wille PT, Raines EW. Macrophage expression of active MMP-9 induces acute plaque disruption in apoE-deficient mice. *J Clin Invest*. 2006;116:59–69.
- Siefert SA, Sarkar R. Matrix metalloproteinases in vascular physiology and disease. *Vascular*. 2012;20:210–216.
- Nagasawa A, Yoshimura K, Suzuki R, Mikamo A, Yamashita O, Ikeda Y, Tsuchida M, Hamano K. Important role of the angiotensin II pathway in producing matrix metalloproteinase-9 in human thoracic aortic aneurysms. *J Surg Res*. 2013;183:472–477.
- Mocchegiani E, Giacconi R, Costarelli L. Metalloproteases/anti-metalloproteases imbalance in chronic obstructive pulmonary disease: genetic factors and treatment implications. *Curr Opin Pulm Med*. 2011;17 suppl 1:S11–S19.
- Montel V, Gaultier A, Lester RD, Campana WM, Gonias SL. The low-density lipoprotein receptor-related protein regulates cancer cell survival and metastasis development. *Cancer Res*. 2007;67:9817–9824.
- Song H, Li Y, Lee J, Schwartz AL, Bu G. Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 promotes cancer cell migration and invasion by inducing the expression of matrix metalloproteinases 2 and 9. *Cancer Res*. 2009;69:879–886.
- Hahn-Dantona E, Ruiz JF, Bornstein P, Strickland DK. The low density lipoprotein receptor-related protein modulates levels of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) by mediating its cellular catabolism. *J Biol Chem*. 2001;276:15498–15503.

12. Overton CD, Yancey PG, Major AS, Linton MF, Fazio S. Deletion of macrophage LDL receptor-related protein increases atherogenesis in the mouse. *Circ Res*. 2007;100:670–677.
13. Hu K, Yang J, Tanaka S, Gonias SL, Mars WM, Liu Y. Tissue-type plasminogen activator acts as a cytokine that triggers intracellular signal transduction and induces matrix metalloproteinase-9 gene expression. *J Biol Chem*. 2006;281:2120–2127.
14. Llorente-Cortés V, Otero-Viñas M, Sánchez S, Rodríguez C, Badimon L. Low-density lipoprotein upregulates low-density lipoprotein receptor-related protein expression in vascular smooth muscle cells: possible involvement of sterol regulatory element binding protein-2-dependent mechanism. *Circulation*. 2002;106:3104–3110.
15. Sendra J, Llorente-Cortés V, Costales P, Huesca-Gómez C, Badimon L. Angiotensin II upregulates LDL receptor-related protein (LRP1) expression in the vascular wall: a new pro-atherogenic mechanism of hypertension. *Cardiovasc Res*. 2008;78:581–589.
16. Castellano J, Aledo R, Sendra J, Costales P, Juan-Babot O, Badimon L, Llorente-Cortés V. Hypoxia stimulates low-density lipoprotein receptor-related protein-1 expression through hypoxia-inducible factor-1 α in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31:1411–1420.
17. Cal R, Castellano J, Revuelta-López E, Aledo R, Barriga M, Farré J, Vilahur G, Nasarre L, Hove-Madsen L, Badimon L, Llorente-Cortés V. Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 mediates hypoxia-induced very low density lipoprotein-cholesterol uptake and accumulation in cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*. 2012;94:469–479.
18. van der Geer P. Phosphorylation of LRP1: regulation of transport and signal transduction. *Trends Cardiovasc Med*. 2002;12:160–165.
19. Zhang H, Lee JM, Wang Y, Dong L, Ko KW, Pelletier L, Yao Z. Mutational analysis of the FXNXPXY motif within LDL receptor-related protein 1 (LRP1) reveals the functional importance of the tyrosine residues in cell growth regulation and signal transduction. *Biochem J*. 2008;409:53–64.
20. Betts GN, van der Geer P, Komives EA. Structural and functional consequences of tyrosine phosphorylation in the LRP1 cytoplasmic domain. *J Biol Chem*. 2008;283:15656–15664.
21. Ma Z, Thomas KS, Webb DJ, Moravec R, Salicioni AM, Mars WM, Gonias SL. Regulation of Rac1 activation by the low density lipoprotein receptor-related protein. *J Cell Biol*. 2002;159:1061–1070.
22. Yang M, Huang H, Li J, Li D, Wang H. Tyrosine phosphorylation of the LDL receptor-related protein (LRP) and activation of the ERK pathway are required for connective tissue growth factor to potentiate myofibroblast differentiation. *FASEB J*. 2004;18:1920–1921.
23. Geetha N, Mihalý J, Stockenhuber A, Blasi F, Uhrin P, Binder BR, Freissmuth M, Breuss JM. Signal integration and coincidence detection in the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (ERK) cascade: concomitant activation of receptor tyrosine kinases and of LRP-1 leads to sustained ERK phosphorylation via down-regulation of dual specificity phosphatases (DUSP1 and -6). *J Biol Chem*. 2011;286:25663–25674.
24. Loukinova E, Ranganathan S, Kuznetsov S, Gorlatova N, Migliorini MM, Loukinov D, Ulery PG, Mikhailenko I, Lawrence DA, Strickland DK. Platelet-derived growth factor (PDGF)-induced tyrosine phosphorylation of the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). Evidence for integrated co-receptor function between LRP and the PDGF. *J Biol Chem*. 2002;277:15499–15506.
25. Boucher P, Liu P, Gotthardt M, Hiesberger T, Anderson RG, Herz J. Platelet-derived growth factor mediates tyrosine phosphorylation of the cytoplasmic domain of the low density lipoprotein receptor-related protein in caveolae. *J Biol Chem*. 2002;277:15507–15513.
26. Bacskai BJ, Xia MQ, Strickland DK, Rebeck GW, Hyman BT. The endocytic receptor protein LRP also mediates neuronal calcium signaling via N-methyl-D-aspartate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:11551–11556.
27. Nassar T, Akkawi S, Bar-Shavit R, Haj-Yehia A, Bdeir K, Al-Mehdi AB, Tarshis M, Higazi AA. Human alpha-defensin regulates smooth muscle cell contraction: a role for low-density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor. *Blood*. 2002;100:4026–4032.
28. Beitner-Johnson D, Ferguson T, Rust RT, Kobayashi S, Millhorn DE. Calcium-dependent activation of Pyk2 by hypoxia. *Cell Signal*. 2002;14:133–137.
29. Avraham H, Park SY, Schinkmann K, Avraham S. RAFTK/Pyk2-mediated cellular signalling. *Cell Signal*. 2000;12:123–133.
30. Llorente-Cortés V, Otero-Viñas M, Berrozpe M, Badimon L. Intracellular lipid accumulation, low-density lipoprotein receptor-related protein expression, and cell survival in vascular smooth muscle cells derived from normal and atherosclerotic human coronaries. *Eur J Clin Invest*. 2004;34:182–190.
31. Liu YV, Hubbi ME, Pan F, McDonald KR, Mansharamani M, Cole RN, Liu JO, Semenza GL. Calcineurin promotes hypoxia-inducible factor 1 α expression by dephosphorylating RACK1 and blocking RACK1 dimerization. *J Biol Chem*. 2007;282:37064–37073.
32. Zhu WH, Conforti L, Czyzyk-Krzaska MF, Millhorn DE. Membrane depolarization in PC-12 cells during hypoxia is regulated by an O₂-sensitive K⁺ current. *Am J Physiol*. 1996;271(2 pt 1):C658–C665.
33. Schaller MD. Cellular functions of FAK kinases: insight into molecular mechanisms and novel functions. *J Cell Sci*. 2010;123(pt 7):1007–1013.
34. Yuan G, Khan SA, Luo W, Nanduri J, Semenza GL, Prabhakar NR. Hypoxia-inducible factor 1 mediates increased expression of NADPH oxidase-2 in response to intermittent hypoxia. *J Cell Physiol*. 2011;226:2925–2933.
35. Voelkel NF, Bogaard HJ, Al Hussein A, Farkas L, Gomez-Arroyo J, Natarajan R. Antioxidants for the treatment of patients with severe angioproliferative pulmonary hypertension? *Antioxid Redox Signal*. 2013;18:1810–1817.
36. Chandel NS, Maltepe E, Goldwasser E, Mathieu CE, Simon MC, Schumacker PT. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:11715–11720.
37. Bell EL, Klimova TA, Eisenbart J, Schumacker PT, Chandel NS. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-inducible factor-dependent extension of the replicative life span during hypoxia. *Mol Cell Biol*. 2007;27:5737–5745.
38. Yang CM, Lee IT, Hsu RC, Chi PL, Hsiao LD. NADPH oxidase/ROS-dependent PYK2 activation is involved in TNF- α -induced matrix metalloproteinase-9 expression in rat heart-derived H9c2 cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2013;272:431–442.
39. Martel-Gallegos G, Casas-Pruneda G, Ortega-Ortega F, Sánchez-Armass S, Olivares-Reyes JA, Diebold B, Pérez-Cornejo P, Arreola J. Oxidative stress induced by P2X7 receptor stimulation in murine macrophages is mediated by c-Src/Pyk2 and ERK1/2. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1830:4650–4659.
40. Daou GB, Srivastava AK. Reactive oxygen species mediate Endothelin-1-induced activation of ERK1/2, PKB, and Pyk2 signaling, as well as protein synthesis, in vascular smooth muscle cells. *Free Radic Biol Med*. 2004;37:208–215.
41. Sabri A, Govindarajan G, Griffin TM, Byron KL, Samarel AM, Lucchesi PA. Calcium- and protein kinase C-dependent activation of the tyrosine kinase PYK2 by angiotensin II in vascular smooth muscle. *Circ Res*. 1998;83:841–851.
42. Eguchi S, Iwasaki H, Inagami T, Numaguchi K, Yamakawa T, Motley ED, Owada KM, Marumo F, Hirata Y. Involvement of PYK2 in angiotensin II signaling of vascular smooth muscle cells. *Hypertension*. 1999;33(1 pt 2):201–206.
43. Otero-Viñas M, Llorente-Cortés V, Peña E, Padró T, Badimon L. Aggregated low density lipoproteins decrease metalloproteinase-9 expression and activity in human coronary smooth muscle cells. *Atherosclerosis*. 2007;194:326–333.
44. Padró T, Peña E, García-Arguinzon M, Llorente-Cortés V, Badimon L. Low-density lipoproteins impair migration of human coronary vascular smooth muscle cells and induce changes in the proteomic profile of myosin light chain. *Cardiovasc Res*. 2008;77:211–220.
45. Andersen OM, Vorum H, Honoré B, Thøgersen HC. Ca²⁺ binding to complement-type repeat domains 5 and 6 from the low-density lipoprotein receptor-related protein. *BMC Biochem*. 2003; 18: 4–7.
46. Loeser RF, Forsyth CB, Samarel AM, Im HJ. Fibronectin fragment activation of proline-rich tyrosine kinase PYK2 mediates integrin signals regulating collagenase-3 expression by human chondrocytes through a protein kinase C-dependent pathway. *J Biol Chem*. 2003;278:24577–24585.
47. Sun CK, Man K, Ng KT, Ho JW, Lim ZX, Cheng Q, Lo CM, Poon RT, Fan ST. Proline-rich tyrosine kinase 2 (Pyk2) promotes proliferation and invasiveness of hepatocellular carcinoma cells through c-Src/ERK activation. *Carcinogenesis*. 2008;29:2096–2105.
48. Nicodemo AA, Pampillo M, Ferreira LT, Dale LB, Cregan T, Ribeiro FM, Ferguson SS. Pyk2 uncouples metabotropic glutamate receptor G protein signaling but facilitates ERK1/2 activation. *Mol Brain*. 2010;3:4.
49. Zhao W, Darmanin S, Fu Q, Chen J, Cui H, Wang J, Okada F, Hamada J, Hattori Y, Kondo T, Hamuro J, Asaka M, Kobayashi M. Hypoxia suppresses the production of matrix metalloproteinases and the migration of human monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol*. 2005;35:3468–3477.

50. Choi JY, Jang YS, Min SY, Song JY. Overexpression of MMP-9 and HIF-1 α in Breast Cancer Cells under Hypoxic Conditions. *J Breast Cancer*. 2011;14:88–95.
51. Romanic AM, Burns-Kurtis CL, Gout B, Berrebi-Bertrand I, Ohlstein EH. Matrix metalloproteinase expression in cardiac myocytes following myocardial infarction in the rabbit. *Life Sci*. 2001;68:799–814.
52. Shi CS, Kehrl JH. PYK2 links G(q)alpha and G(13)alpha signaling to NF-kappa B activation. *J Biol Chem*. 2001;276:31845–31850.
53. Wouters BG, Koritzinsky M. Hypoxia signalling through mTOR and the unfolded protein response in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2008;8:851–864.
54. Nakashima H, Aoki M, Miyake T, Kawasaki T, Iwai M, Jo N, Oishi M, Kataoka K, Ohgi S, Ogihara T, Kaneda Y, Morishita R. Inhibition of experimental abdominal aortic aneurysm in the rat by use of decoy oligodeoxynucleotides suppressing activity of nuclear factor kappaB and ets transcription factors. *Circulation*. 2004;109:132–138.
55. Bourguignon LY, Wong G, Earle C, Krueger K, Spevak CC. Hyaluronan-CD44 interaction promotes c-Src-mediated twist signaling, microRNA-10b expression, and RhoA/RhoC up-regulation, leading to Rho-kinase-associated cytoskeleton activation and breast tumor cell invasion. *J Biol Chem*. 2010;285:36721–36735.
56. Brudecki L, Ferguson DA, McCall CE, El Gazzar M. MicroRNA-146a and RBM4 form a negative feed-forward loop that disrupts cytokine mRNA translation following TLR4 responses in human THP-1 monocytes. *Immunol Cell Biol*. 2013;91:532–540.

Significance

Our study highlights for the first time the crucial role of low-density lipoprotein receptor–related protein 1–phosphorylation of proline-rich tyrosine kinase 2–nuclear factor- κ B axis on extracellular metalloproteinases-9 levels and vascular smooth muscle cell migration induced by hypoxia. Therefore, we propose a new crucial low-density lipoprotein receptor–related protein 1 pathway modulating vascular extracellular matrix remodeling associated with human hypoxic vascular–related diseases. Moreover, we showed that this pathway should have higher impact in the vascular wall when modified lipids are not yet present such as aneurysms, chronic obstructive pulmonary disease, or in very early stages of atherosclerosis. Both low-density lipoprotein receptor–related protein 1 silencing and PP2 treatments ensure effective prevention of hypoxia-induced vascular remodeling. However, these treatments also have a potential impact on the human vascular smooth muscle cell proinflammatory phenotype. Therefore, the translation of these preventive treatments to therapeutic strategies requires the development of adequate in vivo models to test the capacity of these potential novel interventions to counteract vascular remodeling without promoting inflammation.

MATERIALS AND METHODS

Human VSMC (hVSMC) culture

The media layer of atherosclerotic plaque-free human coronary arteries was processed using a modification of the explant method for isolation of VSMC as previously described.^{1,2} In some experiments, normal or plaque-VSMC were obtained from the intima of nonatherosclerotic areas or advanced atherosclerotic lesions, respectively. Vessels were obtained at surgery from patients undergoing cardiac transplantation at Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, and cut into 1mm x 1mm tissue pieces in the culture unit. These explants of medial tissue were incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. After 1 week, the cells started to grow out radially from the explants and proliferated covering the culture dishes. Cells used in the experiments were between the fourth and sixth passage and were characterized by Western blot analysis for specific differentiation markers (α -actin, 45 kDa; and calponin, 33 kDa). Cell monolayers were grown to 80% confluence in medium 199 supplemented with 20% (v/v) FBS, 2% (v/v) human serum, 2 mmol/L L-glutamine, 100 U/mL penicillin G and 100 μ g/mL streptomycin. The protocol was approved by the Research Ethics Committee at the study centre and was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki.

Mouse VSMC (mVSMC) culture

Care of animals was in accordance with institutional guidelines and regulations, and animal procedures were approved by the Research Ethics Committee. Mouse VSMC were harvested from the aorta of wild type C57BL/6 mice as previously described.³ VSMCs were cultured in medium DMEM supplemented with 10% (v/v) FBS, 2mmol/L L-glutamine, 100U/ml penicillin G and 100 μ g/mL streptomycin. Cells used in the experiments were between the fifth and sixth passage, and cell monolayers were grown to 80% confluence.

Isolation, differentiation and culture of human monocyte-derived macrophages (HMDM)

HMDMs were isolated by standard protocols from buffy coats (35–40 mL) of healthy donors. This protocol complied with the Declaration of Helsinki and was approved by the Institutional

Committee on Human Research at Hospital of Santa Creu i Sant Pau. Cells were applied on 15 mL of Ficoll-Hypaque and centrifuged at 400×g for 40 min at 22°C, with no brake. Mononuclear cells were obtained from the central white band of the gradient, exhaustively washed in PBS, and resuspended in RPMI medium supplemented with 10% human AB serum, 1% P/S and 1% HEPES. Cells were allowed to differentiate into macrophages by exposure to 10% human AB serum for 7 days, changing the medium every other day.

Cell exposure to normoxic and hypoxic conditions

VSMCs or HMDMs were deprived of serum once they reached 80% confluence. Cells were exposed to normoxia (21% O₂) in a incubator with gas mixtures consisting of 74% N₂ and 5% CO₂ or to hypoxia (1% O₂) in a Hypoxic/Anoxic Workstation: H35 (Don Whitley Scientific Ltd.) with 94% N₂ and 5% CO₂. Cells were then harvested by scraping in Tripure™ Isolation Reagent (Roche Molecular Diagnostics) for PCR, Western blot, and immunoprecipitation analysis. Culture supernatants were finally collected for zymographic studies.

Small-interfering RNA (siRNA) gene silencing in hVSMCs

To specifically inhibit LRP1 expression, hVSMC were transfected with annealed siRNA (siRNA-LRP1) synthesized by Ambion according to our previously published LRP1 target sequences.¹ siRNA-LRP1 was a 15-mer (5'-CGGCGGGTCAGCAT-3') oligonucleotide complementary to nucleotides 466 to 481 of LRP mRNA. To specifically inhibit MMP9 expression, hVSMC were transfected with annealed siRNA (siRNA-MMP9; 600nM) (Ambion AM 16704). A siRNA-random was used as a negative control (Ambion AM 4636) in cellular transfections. Fasta analysis (in the Genetic Computer Group package) indicated that these sequences would not hybridize to other receptor sequences (including LDL receptors) in the GenBank database. The hVSMCs were transfected with siRNA by the nucleofection technique using the Human AoSMC Nucleofector Kit from LONZA (VPC 1001) according to the manufacturer's instructions. The final siRNA transfection concentration for siRNA-LRP1 was

0.6 $\mu\text{mol/L}$. After 48 hours of transfection, cells were exposed to normoxia or hypoxia for the tested time points and harvested by scraping in TriPure™ Isolation Reagent (Roche Molecular Diagnostics) for subsequent PCR and Western blot analysis.

Isolation of nuclear and cytosolic extracts from VSMCs

Nuclear and cytosolic extracts were obtained from hVSMC exposed to hypoxia for 4, 8 and 18 hours in absence or presence of PP2 (50 μM) using the Protein and RNA Isolation System™ Kit (Ambion Inc., Austin, TX) according to the manufacturer's recommendations. Cytosolic and nuclear extracts were aliquoted and stored at -80°C until use.

Western blotting

After normoxic or hypoxic treatment, cells were washed with PBS and total protein was isolated by TriPure™ Isolation Reagent (Roche Molecular Biochemicals) according to the manufacturer's instructions. Equivalent amounts of total protein (25 μg) were electrophoresed under non-reducing (for LRP1 detection) and reducing (for pERK1,2, total ERK1,2, pPyk2, total Pyk2, pSrc, total Src, HIF1 α , IK β α , Phospho p65, NF- κB total P65, nucleolin and β -tubulin) conditions on polyacrylamide gels for SDS-PAGE. The samples were electrotransferred to nitrocellulose, and the membranes were saturated at room temperature for 1 hour in TTBS (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 500 mM NaCl, 0.01 % Tween 20, and 5 % non-fat milk). Western blot analyses were performed with specific monoclonal antibodies (*online* Table 1) and the corresponding secondary antibodies (1: 10000 dilution; Dako). Equal protein loading was verified with Ponceau staining and by performing blotting of Western blots with β -tubulin (Abcam, ab6046, 1:1000 dilution). Bands were detected using the ECL prime Western blotting detection reagent (Amersham) and quantified by densitometry using ChemiDoc system and Quantity-One software (Bio-Rad). Results are expressed as arbitrary units of intensity.

Real time PCR

Serum-deprived cells under normoxia or hypoxia were washed with PBS and total RNA was isolated by TriPure isolation reagent (Roche Molecular Biochemicals) according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription was performed using the high capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems), and the reaction mix was subjected to quantitative real-time PCR to detect LRP1, MMP-9, MMP-2, IL-1 β , MCP-1 and IL-6 mRNA expression using the assays on demand (Applied Biosystems) detailed in *online* Table 2. Human TATA-binding protein TBP expression (4326322E) and ARBP expression (Rn00821065_g1) (Applied Biosystems) were unaltered by hypoxia and used as internal control for human and mice gene amplification, respectively. Real time PCR was performed using 1 μ L/well of reverse transcription products in 10 μ L of TaqMan PCR master mix (PE Biosystem) with primers at 300 nM and probe at 200 nM. PCR was performed in a PCR-7600HT sequence detection system (Abiprism, Applied Biosystems) at 95°C for 10 minutes for AmpliTaq Gold activation, and then run for 40 cycles at 95°C for 15 seconds and 60°C for 1 minute. The relative levels of gene expression were quantified and analyzed using SDS 2.4 software. The real-time value for each sample was averaged and compared using the C_T method, where the amount of target RNA ($2^{-\Delta\Delta CT}$) was normalized to the endogenous control (ΔC_T) and related to the amount of target gene in the cells.

Gelatin Zymography

The relative amount of MMP-9 and MMP-2 activities in the cell culture supernatant was measured by zymography. Media derived from each condition was dialyzed against 0.01M NH_4HCO_3 , lyophilized and resuspended in RIPA buffer (150 mM NaCl, 1% (v/v) Triton X-100, 0.5% (w/v) sodium deoxycholate, 0.1% (w/v) SDS, 2 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8) supplemented with complete protease inhibitor cocktail (Roche). Supernatants were mixed with 2X non-reducing loading buffer (10% (w/v) SDS, 0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 0.5 % (w/v) bromophenol blue, 10% (w/v) Sucrose) and equal volumes of each sample were loaded in 10% (v/v) SDS-polyacrylamide gel with 1 mg/mL porcine skin type A gelatin (Sigma-Aldrich) as a substrate for MMPs enzymatic activity, and run at 4 °C for 4-6 h. After electrophoresis, the gels

were rinsed twice for 30 min at room temperature in 2.5 % Triton X-100 (Sigma), and then incubated in substrate buffer (50 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl₂ (Merk), 0.02% (w/v) N₃Na (Fluka), pH 8) for 18-20 h at 37 °C. They were dyed with 10% acetic acid with one tablet of PhastGel™ Blue R (GE Healthcare). Areas of gelatinolytic activity appeared as clear bands on a blue background where the protease has digested the substrate. Gels were finally scanned with a GS-800 calibrated imaging densitometer (Bio-Rad) and quantitative densitometric analysis of digested bands was performed using Quantity-One software (Bio-Rad).

Immunoprecipitation of total LRP1 protein

50 µL of Dynabeads Protein G (Novex, Life technologies) were incubated with anti-LRP1β chain antibodies (Epitomics, 2703-1, dilution 1:50) for 10 minutes at RT in an orbital shaker. Cellular protein extracts were incubated with the Dynabeads-LRP1 antibody complex for 30 minutes at RT in an orbital shaker. The Dynabeads-Antibody-Antigen (LRP1 protein) complex was then washed four times until the elution of target protein. Samples were separated by SDS-PAGE and transferred blots were incubated with Ab against pPyk2.

Indirect immunofluorescence

Indirect immunofluorescence experiments were performed on cells grown in β-Dish culture plates (Ibidi, Martinsried, Germany) and paraffin-processed serial sections (5 µm) of human coronary arteries collected from patients undergoing heart transplant surgery at the Hospital de la Santa Creu I Sant Pau (HSCSP) (Barcelona, Spain) with the approval of the ethics committee of the HSCSP. Samples were fixed with 4% paraformaldehyde, permeabilized with magnesium-free PBS supplemented with horse serum (dilution 1/5) (GIBCO, Invitrogen, El Prat de Llobregat, Spain) and 0.2% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), and immunostained using primary antibodies against pPyk2 (dilution 1/50) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX), total Pyk2 (dilution 1/50) (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA), and MMP-9 (dilution 1/200, Torrey Pines Biolabs, East Orange, NJ). Subsequently, samples were incubated with Cy3- and Cy5- conjugated secondary antibodies (Jackson Immuno Research Laboratories).

Actin fibers and cell nuclei were also counterstained using Phalloidin 568 (dilution 1/40) (Invitrogen, Life Technologies, Paisley, UK) and Hoechst 33342 (0.25 µg/ml) (Sigma-Aldrich Química, Madrid, Spain) respectively. Cells were finally analyzed under a Leica TCS SP5 confocal microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

Oxidative stress

Levels of oxidative stress were measured by detection of free radicals with dihydroethidium (DHE, Invitrogen, D-23107). Transfected siRNA LRP1 hVSMC cells were seeded on sterile culture dishes and were grown one day. Cells were then treated with DHE 10^{-5} M for 30 min at 37°C and washed two times with PBS 1x. ROS was assessed by fluorescence microscopy. Photographs were taken with an exposure of 200 ms, a gain of 1x and 10x magnification. The surface covered by fluorescence was calculated using NIH Image software (public domain software developed by Dr Wayne Rasband, National Institutes of Health, version 1.62).

Cell migration and wound repair assays

VSMC were seeded on glass-bottom sterile culture dishes. Confluent cells were scratched to create a double-sided wound^{4,5} and washed with PBS. Human and mouse VSMC were grown in M199 and DMEM, respectively, supplemented with FBS (10%), penicillin/streptomycin (1%), L-glutamine (1%). Photographs were taken after indicated times, and cell migration and wound repair were analysed measuring the injured area covered by cells counted from the wounding borders with the Image J software.

Immunohistochemical analysis

Paraffin-processed serial sections (5µm) were deparaffinised in xylene and rehydrated in graded ethanol solutions. Slices were then rinsed in distilled water and treated with 10% hydrogen peroxide in methanol (30 minutes at RT) to remove endogenous peroxidase activity. Sections were blocked with a 5% of normal serum in PBS-tween 0,1% (30 minutes at RT). Slices with

the coronary specimens were then incubated with the specific dilution of primary antibody pPyk2 (dilution 1/50), MMP-9 (dilution 1/200), HIF-1 α (dilution 1/50), LRP1 (dilution 1/100) and α -actin (dilution 1/100) (*on line* Table 3) overnight at 4°C. After washing three times in PBS, biotinylated secondary antibody (Vector Laboratories) was used at a 1:200 dilution, and incubated at RT for 1 hour. After rinsing in PBS, standard Vectastain (ABC) avidin-biotin peroxidase complex (Vector Laboratories) was applied, and the slices were incubated at RT 30 minutes. Colour was developed using 3,3'-diaminobenzidine (DAB) and sections were counterstained with haematoxylin before rehydration, clearing, and mounting.

Image analysis

Results were evaluated with an Olympus Vanox AHB3 microscope (Leica, Barcelona, Spain) and digitalized by a Sony 3CCd camera (Leica). The expression of HIF-1 α , LRP1, α -actin, pPyk2 and MMP-9 proteins was semiquantitatively assessed by scoring the proportion of staining.⁶ First, the entire section was systematically scanned at x200 magnification and five nonoverlapping fields were selected to perform the analysis. The percentage of positive staining with each specific antibody was determined, by using the Visilog 4-12 ImageAnalysis System (Leica), dividing the total area of the field. The results were expressed as percentage of positive areas and are shown as the mean \pm SEM of semiquantifications from a minimum of five sections each, from coronary lesions processed in independent immunostainings.

Statistical analysis

Comparisons among groups were performed by parametric (one-factor ANOVA) or nonparametric (Mann-Whitney *U*-test) analysis as needed. Statistical significance was considered when $P < 0.05$

RESULTADOS

Tables

Primary Antibody	Company	Reference
LRP1 β chain	Epitomics	#2703-1
Phospho Pyk2	Cell Signalling technology	#3291
Total Pyk2	Cell Signalling technology	#3480
Phospho ERK1,2	Cell Signalling technology	#9101
Total ERK 1,2	Assay Designs	KAP-MA001
β Tubulin	Abcam	Ab6046
pSrc	Cell Signalling technology	#2105
Total Src	Cell Signalling technology	#2109
HIF1 α	Novus Biologicals	NB100-449
PDGF-BB	Santa Cruz	Sc-365805
PDGF R β	R&D Systems	MAB1263
I κ B α	Cell Signalling technology	#4814
Phospho-NF-kB p65	Cell signaling technology	#3039
NF-kB p65l	Cell signaling technology	#4764
Nucleolin	Abcam	Ab22758

Table 1. References of primary antibodies

Assay on demand	Species	Reference
LRP1	Human	Hs00233899 m1
MMP-9	Human	Hs00234579 m1
MMP-2	Human	Hs00234422 m1
LRP1	Mouse	Mm00464608 m1
IL-1 β	Human	Hs00174097_m1
MCP-1	Human	Hs00234140_m1
IL-6	Human	Hs00174131_m1
MMP-9	Mouse	Mm00600163 m1
MMP-2	Mouse	Mm00439498 m1

Table 2. References of assays-on-demand

Primary Antibody	Company	Reference
Phospho Pyk2	Santa Cruz	Sc-16824
MMP9	Torrey Pines Biolabs	TP-221
HIF1 α	Novus Biologicals	NB100-105
LRP1	Epitomics	2703-1
α -actin	Dako	IS611

Table 3. References of primary antibody for immunohistochemical analysis.

	Control		PP2	
	Normoxia	Hypoxia	Normoxia	Hypoxia
IL-1 β	47.31 \pm 1.22	64.50 \pm 6.07*	2258 \pm 367 [#]	1203 \pm 204 [#]
MCP-1	61.49 \pm 1.94	60.09 \pm 8.67	168 \pm 3.00 [#]	176 \pm 5 [#]
IL-6	67.93 \pm 16.00	118.54 \pm 14.00*	555 \pm 46 [#]	492 \pm 33 [#]

Table 4. Effect of PP2 on IL-1 β , MCP-1 and IL-6 mRNA expression in hVSMC exposed to normoxic and hypoxic conditions. * P <0.05 vs normoxic cells, [#] P <0.05 vs control.

References

1. Llorente-Cortés V, Martínez-González J, Badimon L. LDL receptor-related protein mediates uptake of aggregated LDL in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20: 1572-1579.
2. Llorente-Cortés V, Otero-Viñas M, Sánchez S, Rodríguez C, Badimon L. Low-density lipoprotein upregulates low-density lipoprotein receptor-related protein expression in vascular smooth muscle cells: possible involvement of sterol regulatory element binding protein-2-dependent mechanism. *Circulation.* 2002; 106: 3104-3110.
3. Andrés V, Ureña J, Poch E, Chen D, Goukassian D. Role of Sp1 in the induction of p27 gene expression in vascular smooth muscle cells in vitro and after balloon angioplasty. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21: 342-347.
4. Otero-Viñas M, Llorente-Cortés V, Peña E, Padró T, Badimon L. Aggregated low density lipoproteins decrease metalloproteinase-9 expression and activity in human coronary smooth muscle cells. *Atherosclerosis.* 2007; 194: 326-333.
5. Padró T, Peña E, García-Arguinzonis M, Llorente-Cortés V, Badimon L. Low-density lipoproteins impair migration of human coronary vascular smooth muscle cells and induce changes in the proteomic profile of myosin light chain. *Cardiovasc Res.* 2008; 77: 211-220.
6. Llorente-Cortés V, Otero-Viñas M, Berrozpe M, Badimon L. Intracellular lipid accumulation, low-density lipoprotein receptor-related protein expression, and cell survival in vascular smooth muscle cells derived from normal and atherosclerotic human coronaries. *Eur J Clin Invest.* 2004; 34: 182-190.

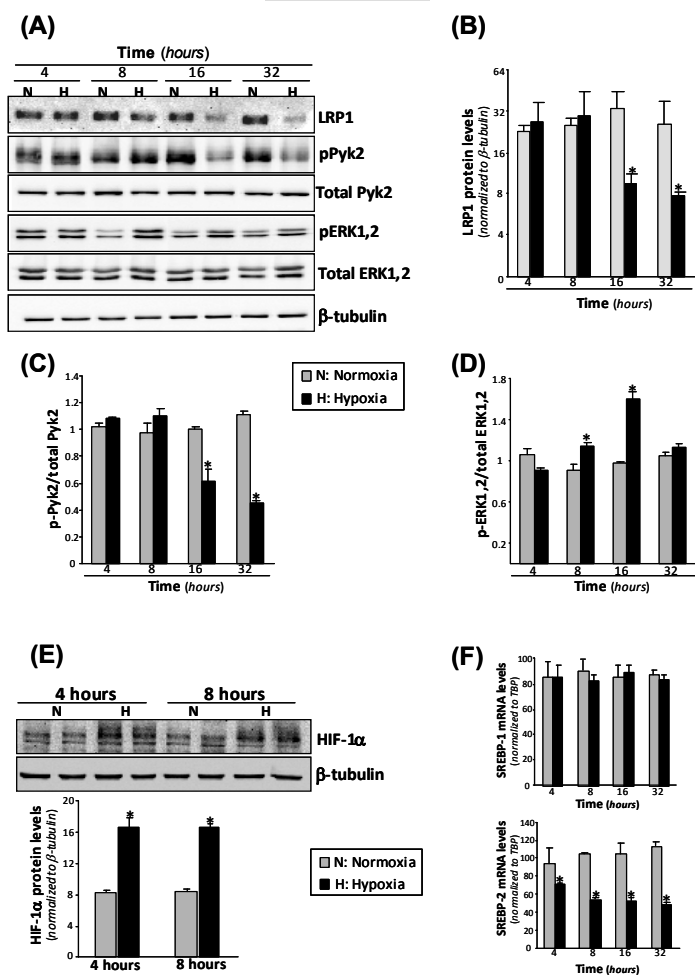
ATVB/2013/302323D

R4

SUPPLEMENTAL MATERIAL

On-line Figures

mVSMC



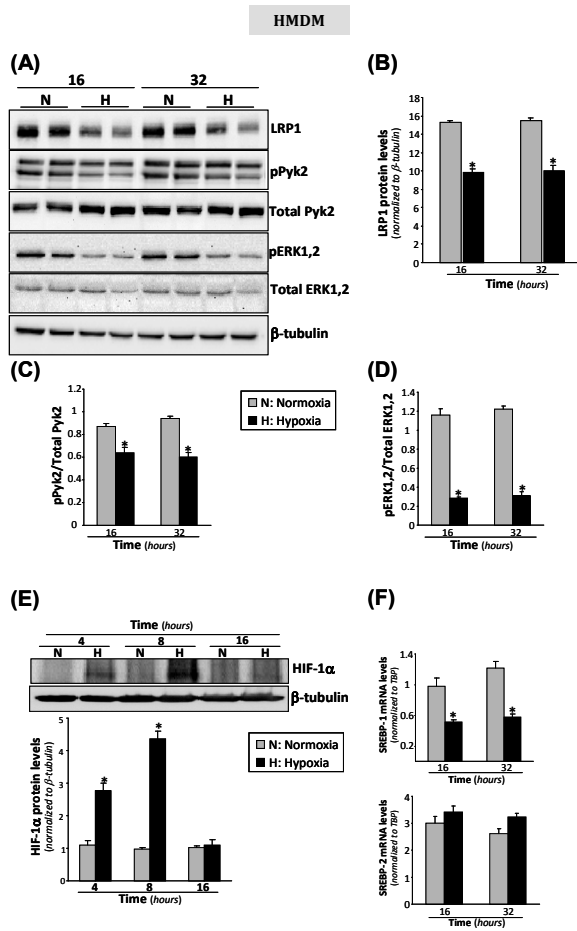
Online Figure I

Online Fig. I. Time-course of hypoxic modulation of pPyk2, pERK1,2, HIF-1α and SREBPs levels in mVSMC. mVSMC were exposed to either normoxia or hypoxia for 4, 8, 16, and 32 hours. (A) Representative Western blot analysis showing LRP1, pPyk2 and total Pyk2, pERK1,2 and total ERK1,2 protein, and HIF-1α levels at indicated times under hypoxia. β-tubulin was detected as loading control. Bar graphs represent quantification of LRP1 (B),

ATVB/2013/302323D

R4

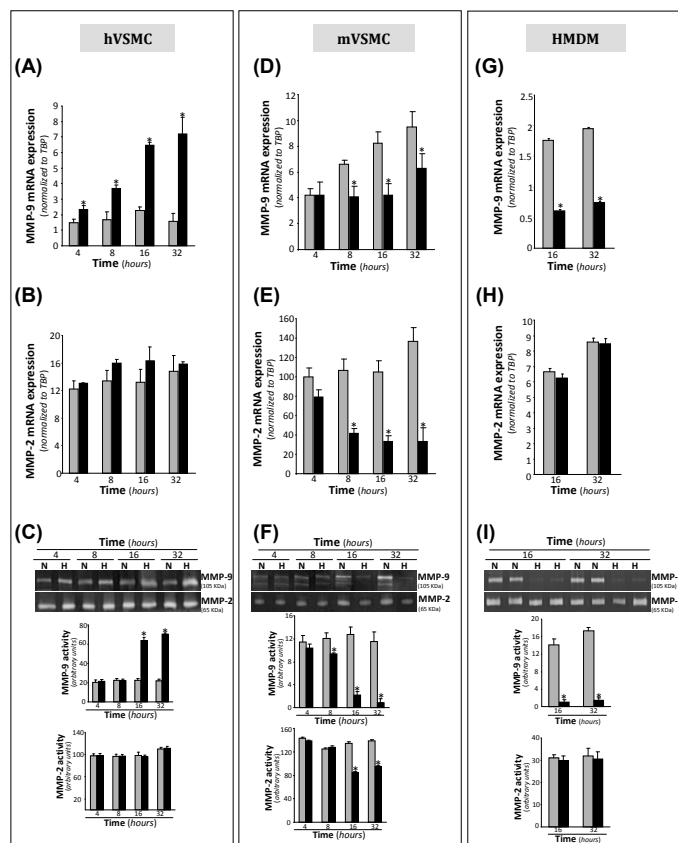
pPyk2/total Pyk2 (C), pERK1,2/total ERK1,2 ratio (D), and HIF-1 α (E) levels in normoxia (N, gray bars) or hypoxia (H, black bars). F) Real time PCR experiments showing the effect of hypoxia on SREBP-1 and SREBP-2 mRNA levels. Results from two independent experiments performed in duplicate are expressed as mean \pm SEM. * P <0.05 vs normoxic cells.



Online Fig. II. Time-course of hypoxic modulation of pPyk2, pERK1,2, HIF-1 α and SREBPs levels in HMDM. HMDM were exposed to either normoxia or hypoxia for 16 and 32 hours. A, Representative Western blot analysis showing LRP1 protein levels, pPyk2 and total Pyk2, pERK1,2 and total ERK1,2, and HIF-1 α in HMDM incubated for increasing times under hypoxia. Unchanged levels of β -tubulin are shown as loading control. Bar graphs showing the quantification of LRP1 (B), pPyk2/total Pyk2 (C), pERK1,2/total ERK1,2 (D) and HIF-1 α (E) in normoxic (gray bars) or hypoxic (black bars) HMDM. F) Real time PCR experiments showing the effect of hypoxia on SREBP-1 and SREBP-2 mRNA levels. N, normoxia; H, hypoxia. Data from two independent experiments performed in duplicate are expressed as mean \pm SEM. * P <0.05 vs normoxic cells.

ATVB/2013/302323D

R4

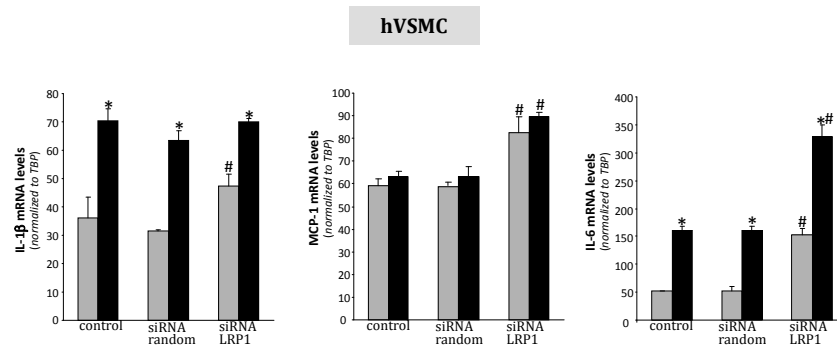


Online Figure III

Online Fig. III. Time-course of the hypoxic modulation of MMP-9/MMP-2 expression and activation in human VSMC, mouse VSMC and HMDM. Human VSMC (left panel), mouse VSMC (middle panel) and human macrophages (right panel) were exposed to either normoxia or hypoxia for increasing times and harvested to assess MMP-9 (A,D,G) and MMP-2 (B,E,H) expression using quantitative RT-PCR. Endogenous gene reference was *TBP*. Representative zymographic analysis detecting MMP-9 and MMP-2 in conditioned media from normoxic and hypoxic cells and bar graphs showing the quantification of bands (C,F,I). Results from two experiments performed in duplicate were expressed as mean \pm SEM. * $P < 0.05$ vs normoxic cells.

ATVB/2013/302323D

R4

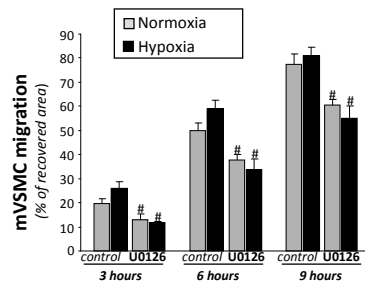
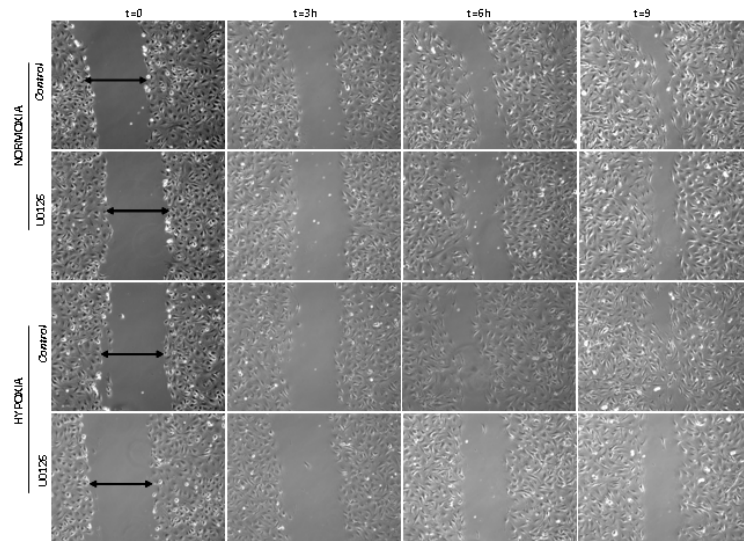


Online Figure IV

Online Fig. IV. Effect of specific abrogation of LRP1 on IL-1 β , MCP-1 and IL-6 mRNA levels of hVSMC exposed to normoxic and hypoxic conditions. Quiescent hVSMC were transfected with *siRNA*-LRP1 or *siRNA*-random (0.6 μ mol/L) by nucleofection. Control cells were nucleofected in absence of siRNA. VSMC were exposed to normoxia or hypoxia and harvested at 18 hours to test IL-1 β , MCP-1 and IL-6 mRNA levels by real time PCR. * P <0.05 vs normoxic cells; # P <0.05 vs control or siRNA-random VSMC.

ATVB/2013/302323D

R4

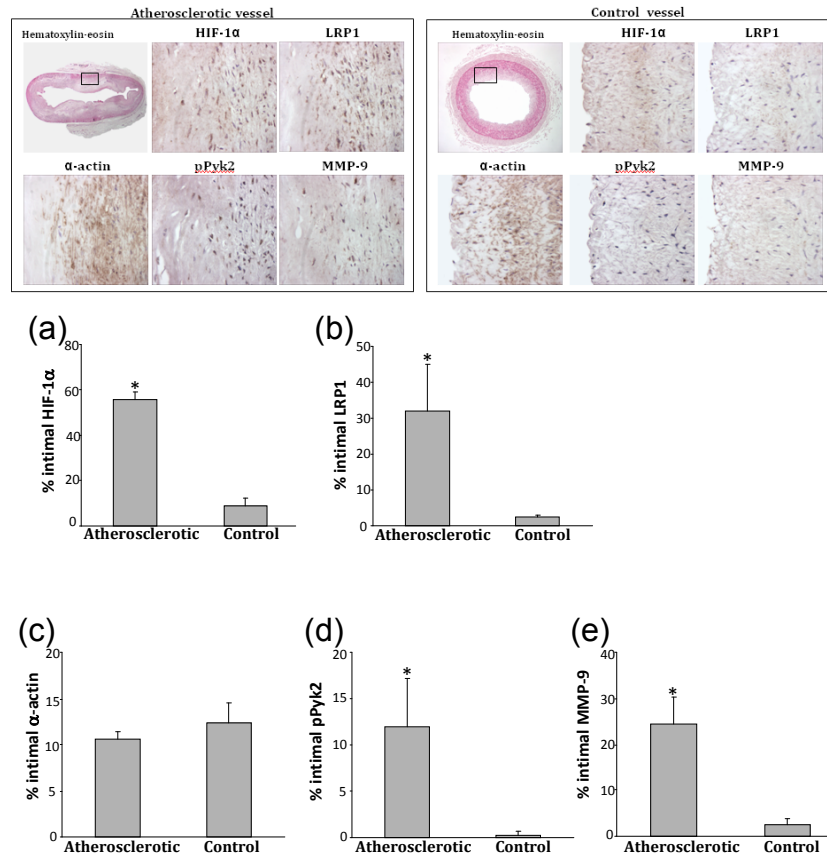


Online Figure V

Online Fig. V. Effect of hypoxia on mouse VSMC migration. A) Phase-contrast microscopy images showing the migratory capacity of untreated and U0126-treated mVSMC. B) Bar graphs represent quantification of cell migration rate over time. Data from three independent experiments performed in duplicate are expressed as mean ± SEM. #P<0.05 vs control cells.

ATVB/2013/302323D

R4



Online Figure VI

Online Fig. VI. Image analysis quantification of HIF-1α, LRP1, α-actin, pPyk2 and MMP-9 in human atherosclerotic and normal vessels. Immunohistochemistry analysis showing representative Masson Trichromic staining of human atherosclerotic lesions and normal areas. Representative α-actin, HIF-1α, LRP1, pPyk2 and MMP-9 staining. Empty squares indicate the areas selected for magnification. Magnification x 400. Bar graphs showing the percentage of HIF-1α, LRP1 (b), α-actin (c), pPyk2 (d) and MMP-9 (e) positive areas in the vessel wall. Results are expressed as the percentage of marker-positive areas and shown as mean±SEM of semiquantifications of five sections each, from coronary lesions processed in independent immunostainings. *P<0.05 vs control vessels.

RESULTADOS: ARTÍCULO 2

Cardiomyocyte intracellular cholesteryl ester accumulation promotes tropoelastin physical alteration and degradation. Role of LRP1 and cathepsin S

TITULO TRADUCIDO: La acumulación intracelular de ésteres de colesterol en el cardiomiocito, promueve alteraciones físicas y degradación de tropoelastina. Papel del receptor LRP1 y de catepsina S.

REVISTA: The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2014; 55:209-219.

AUTORES: Valerie Samouillan^{1*}, **Elena Revuelta-López**^{2*}, Jany Dandurand¹, Laura Nasarre², Lina Badimon², Colette Lacabanne¹, Vicenta Llorente-Cortés².

¹Physique des Polymères, Institut Carnot, CIRIMAT UMR 5085, Université Paul Sabatier, Bat 3R1B2, 118 route Narbonne, 31062 Toulouse Cedex 04, France.

²Centro de Investigación Cardiovascular CSIC-ICCC, IIB-Sant Pau, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, España.

* These authors have contributed equally to the manuscript.



Contents lists available at ScienceDirect

The International Journal of Biochemistry & Cell Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biociel

Cardiomyocyte intracellular cholesteryl ester accumulation promotes tropoelastin physical alteration and degradation Role of LRP1 and cathepsin S



Valerie Samouillan^{a,*}, Elena Revuelta-López^{b,1}, Jany Dandurand^a, Laura Nasarre^b,
Lina Badimon^b, Colette Lacabanne^a, Vicenta Llorente-Cortés^b

^a *Physique des Polymères, Institut Carnot, CIRIMAT UMR 5085, Université Paul Sabatier, Bat 3R1B2, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse Cedex 04, France*

^b *Cardiovascular Research Center, CSIC-ICCC, IIB-Sant Pau, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, 08025 Barcelona, Spain*

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 March 2014
Received in revised form 1 September 2014
Accepted 3 September 2014
Available online 16 September 2014

Keywords:

VLDL
Tropoelastin
Cathepsin S
Intracellular cholesterol esters
Cardiomyocyte
Cardiac remodeling

ABSTRACT

Dyslipemia has a direct impact on cardiac remodeling by altering extracellular matrix (ECM) components. One of the main ECM components is elastin, a proteic three-dimensional network that can be efficiently degraded by cysteine proteases or cathepsins. Dyslipemic status in insulin resistance and combined hyperlipoproteinemia diseases include raised levels of very low density lipoproteins (VLDL), triglyceride (TG)-cholesteryl ester (CE)-rich lipoproteins. Enhanced VLDL concentration promotes cardiomyocyte intracellular cholesteryl ester (CE) accumulation in a LRP1-dependent manner. The aim of this work was to analyze the effect of cardiomyocyte intracellular CE accumulation on tropoelastin (TE) characteristics and to investigate the role of LRP1 and cathepsin S (CatS) on these effects. Molecular studies showed that LRP1 deficiency impaired CE selective uptake and accumulation from TG-CE-rich lipoproteins (VLDL + IDL) and CE-rich lipoproteins (aggregated LDL, agLDL). Biochemical and confocal microscopic studies showed that LRP1-mediated intracellular CE accumulation increased CatS mature protein levels and induced an altered intracellular TE globule structure. Biophysical studies evidenced that LRP1-mediated intracellular CE accumulation caused a significant drop of Tg2 glass transition temperature of cardiomyocyte secreted TE. Moreover, CatS deficiency prevented the alterations in TE intracellular globule structure and on TE glass transition temperature. These results demonstrate that LRP1-mediated cardiomyocyte intracellular CE accumulation alters the structural and physical characteristics of secreted TE through an increase in CatS mature protein levels. Therefore, the modulation of LRP1-mediated intracellular CE accumulation in cardiomyocytes could impact pathological ventricular remodeling associated with insulin-resistance and combined hyperlipoproteinemia, pathologies characterized by enhanced concentrations of TG-CE-rich lipoproteins.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Extracellular matrix components such as fibrillar collagen, elastin, and proteoglycans play a wide variety of functions in the cardiovascular system, not only in the mechanics of the blood vessels but also in the heart (Fomovsky et al., 2010). One of

the main extracellular matrix (ECM) proteins is elastin, a proteic three-dimensional network that has a relatively long turnover and half-life. In a situation of dyslipemia, vascular elastin suffers proteolytic degradation through the action of several proteases (Augier et al., 1997; O'Rourke, 2007; Fulop et al., 2012). Our group previously reported that, by inducing intracellular cholesteryl ester (CE) accumulation in human vascular cells, dyslipemic concentrations of LDL provoke crucial alterations in the molecular mobility of the soluble precursor of elastin, tropoelastin (TE) (Samouillan et al., 2012). Intracellular CE accumulation depends on the expression of low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP1), a receptor that is essential for the uptake of aggregated LDL-CE by human vascular

* Corresponding author. Tel.: +33 561556816; fax: +33 561556221.
E-mail addresses: valerie.samouillan@univ-tlse3.fr (V. Samouillan),
cllorente@csic-iccc.org (V. Llorente-Cortés).

¹ These authors have contributed equally to the manuscript.

smooth muscle cells (hVSMC) (Llorente-Cortés et al., 2002, 2006) and of very low density lipoprotein (VLDL) by HL-1 cardiomyocytes (Cal et al., 2012).

High plasma VLDL level is a prevalent characteristic in insulin-resistance (Goldberg, 2001) and combined hyperlipoproteinemia states (Jarauta et al., 2012). Perfusion of hearts with TG-enriched lipoproteins reproduces the metabolic abnormalities of myocardial steatosis (Pillutla et al., 2005). Myocardial steatosis (Granér et al., 2013) and ECM remodelling (Hayden et al., 2006) are crucial events in the cardiometabolic syndrome. Myocardial steatosis, in particular, is considered an independent predictor of diastolic dysfunction in diabetic patients (Rijzewijk et al., 2008). Few studies have analyzed whether or how lipids alter ECM components such as TE, in the myocardium. TE is a key determinant of the response of the heart to mechanical stimulus (Gupta and Grande-Allen, 2006). TE contains one-third glycine amino acids (Sandberg, 1976) and several lysine derivatives that serve as covalent cross-link between protein monomers (Foster et al., 1974). Elastin is considered a three-dimensional network with 60–70 amino acids between two cross-linking points, with the alternation of hydrophilic cross-linking domains and dynamic hydrophobic domains with fluctuating turns, buried hydrophobic residues and main-chain polar atoms forming hydrogen bonds with water (Debelle and Tamburro, 1999; Li and Daggett, 2002; Floquet et al., 2004; Tamburro et al., 2006). This peculiar molecular architecture determines its elastic properties, insolubility and resistance to proteolysis (Mecham, 1991). It is known that pathological conditions such as acute ischemia (Sato et al., 1983) and pressure overload (Henderson et al., 2007) promote elastic fiber disruption. Elastin fragmentation causes plaque rupture and myocardial infarction in a mice model of atherosclerosis (Van der Donckt et al., 2014). Cathepsins (B, S, L and K) are cysteine proteases with a high capacity to degrade extracellular matrix proteins such as elastin and fibrillar collagens (Obermajer et al., 2008). An imbalance of cathepsins and cystatins underlies myocardial remodelling associated with dilated (Ge et al., 2006), ischemic (Sun et al., 2011) and hypertensive cardiomyopathy (Cheng et al., 2006; Diez, 2010). We have previously shown that Cathepsin S (CatS) is strongly increased in lipid-loaded hVSMC and that these high CatS levels may contribute to the strong capacity of lipid-loaded hVSMC to cause elastin fragmentation (Samouillan et al., 2012). Despite the potential role of intracellular lipids on cardiac elastin and cardiac remodelling, the effect of cardiomyocyte intracellular lipids on tropoelastin characteristics is unknown. The aim of this work was to analyze the effect of cardiomyocyte intracellular CE accumulation on the physical characteristics of tropoelastin (TE) and to investigate the role of LRP1 and CatS on these effects.

2. Materials and methods

2.1. Cellular and molecular biology techniques

2.1.1. HL-1 cardiomyocyte cell culture

The murine HL-1 cell line was generated by Dr. W.C. Claycomb (Louisiana State University Medical Centre, New Orleans, Louisiana, USA) and kindly provided by Dr. U Rauch (Charité-Universitätmedizin Berlin). These cells show cardiac characteristics similar to those of adult cardiomyocytes (Claycomb et al., 1998). HL-1 cells were maintained in Claycomb Medium (JRH Biosciences, Lenexa, KS, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA), 100 μ M norepinephrine, 100 units/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin, and L-glutamine 2 mM (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) in plastic dishes, coated with 12.5 μ g/mL fibronectin and 0.02% gelatin, in a 5% CO₂ atmosphere at 37 °C.

2.1.2. Zucker diabetic fatty rats

We purchased 7-week-old male ZDF (diabetic animals) and ZDFc (control) rats from Charles River Laboratories (L'Arbresles Cedex, France). Heart from these animals was obtained and immediately frozen at –80 °C. Different aliquotes of homogenized tissue were used to perform lipidic, molecular and physical analysis.

2.1.3. Generation of LRP1-deficient cardiomyocytes

2.1.3.1. Design of LRP1 miRNA lentiviral vectors. Three miR RNAi (XM.8531) sequences were designed to downregulate LRP1 (Accession number. XM.001056970) and cloned into plenti6.4-CMV-MSGW (Invitrogen). We also used previously described (Cal et al., 2012) universal insert negative control (Invitrogen, pcDNATM6.2-GW/miR negative control).

2.1.3.2. Lentiviral particle production. Lentiviral particle production was performed as previously described with some modifications (Vilalta et al., 2009).

2.1.3.3. LRP1-deficient cardiomyocytes generation. Lentivirus stocks and a negative control generated from the resulting constructs were tittered by blasticidin selection. To generate a stock of LRP1-deficient HL-1 cells, they were stably transduced with 10 MOI lentivirus and maintained in a complete medium supplemented with blasticidin (10 μ g/mL) to select blasticidin-resistant colonies. HL-1 cell clones with maximal LRP1 downregulation were selected, grown with blasticidin and used in further experiments. Control and LRP1-deficient HL-1 cardiomyocytes (i8531) were exposed to VLDL+IDL or agLDL (1.8 mM cholesterol, 18 h) and harvested by scraping in TriPure Reagent (Roche) for PCR and Western blot analysis.

2.1.4. Small interference RNA-mediated gene silencing of CatS in HL-1 cardiomyocytes

To inhibit CatS expression in HL-1 cardiomyocytes, cells were transiently transfected with annealed siRNA (siRNA-CatS) (AM16708) synthesized by Life Technologies. A siRNA-random was used as a negative control (Ambion AM 4636) in cellular transfections. Quiescent HL-1 cells were transfected with siRNA by the nucleofection technique using the Cell Line Nucleofector Kit L from Amaxa (VCA-1005) according to the manufacturer's instructions. The final siRNA transfection concentration for siRNA-CatS was 0.6 μ mol/L. After 48 h of transfection, cells were exposed to lipoproteins and harvested by scraping in TriPure Reagent (Roche) for PCR and Western blot analysis.

2.1.5. Lipoprotein isolation and characterization

Lipoproteins were obtained from pooled sera of healthy normolipemic donors who gave their written informed consent. Only samples with a total cholesterol <5.2 mmol/L and triglycerides <1 mmol/L were pooled and frozen. Chylomicrons were firstly separated by ultracentrifugation of human plasma at 100,000 \times g for 30 min at 4 °C. TG-CE-rich lipoproteins (VLDL+IDL) (d_{1,001}–d_{1,019} g/mL) and LDL (d_{1,019}–d_{1,063} g/mL) were obtained by sequential flotation ultracentrifugation for 20 h at 36,000 rpm at 4 °C.

Lipoproteins used in the experiments were less than 24 h old and have no detectable levels of endotoxin (Limulus Amebocyte Lysate test, Bio Whittaker). AgLDL was prepared by vortexing LDL in PBS at room temperature. The formation of LDL aggregates by vortexing was monitored by measuring the turbidimetry (absorbance at 680 nm) as previously described (Llorente-Cortés et al., 2002, 2004). Characterization of TG-CE rich lipoproteins and agLDL including lipids (cholesterol, triglycerides and phospholipids) and apolipoprotein B-100 (apoB) content was

performed by commercial standardized methods (Roche Diagnostics, Switzerland; Wako Chemicals, Germany) adapted to a Cobas c501 autoanalyzer.

2.1.6. Lipid extraction and determination of cholesterol esters (CE), triglycerides (TG) and free cholesterol (FC) content of cardiomyocytes

Quiescent HL-1 cells (4×10^4 cells/cm²) were exposed to TG-CE-rich lipoproteins (1.8 mM cholesterol) and agLDL (1.8 mM cholesterol). HL-1 cardiomyocytes were exhaustively washed and harvested in NaOH 0.1 M. Lipids from rat myocardium and HL-1 cardiomyocytes were extracted as previously described (Cal et al., 2012) and CE, FC and TG content was analyzed by thin layer chromatography. The organic solvent was removed under N₂ stream, the lipid extract was redissolved in dichloromethane and one aliquot was partitioned by thin layer chromatography (TLC). TLC was performed on silica G-24 plates. The different concentrations of standards (a mixture of cholesterol, cholesterol palmitate and triglycerides) were applied to each plate. The chromatographic developing solution was heptane/diethylether/acetic acid (74:21:4, v/v/v). The spots corresponding to cholesteryl esters (CE), triglycerides (TG) and free cholesterol (FC) were quantified by densitometry against the standard curve of cholesterol palmitate, triglycerides and cholesterol, respectively, using a computing densitometer.

2.1.7. Western blot analysis

Blots were incubated with monoclonal antibodies against LRP1 β -chain (Fitzgerald; 10R-L107c, clone 8B8) or CatS (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY Inc. Santa Cruz, CA; sc-271619; dilution 1:100). CatS (E-3) is a mouse monoclonal antibody specific for an epitope mapping between aminoacids 302–331 at the C-terminus of CatS and recognizes precursor (37 kDa) and mature (24 kDa) forms of CatS. To test equal protein loading for the different samples, blots were also incubated with monoclonal antibodies against β -tubulin (Abcam Ab6046).

2.1.8. Indirect immunofluorescence

Indirect immunofluorescence experiments were performed on cells grown in β -dish culture plates (Cal et al., 2012, Martinsried, Germany). Quiescent HL-1 cells were prechilled to 4 °C and washed with cold Claycomb medium containing 1% BSA (M199-BSA). HL-1 cells were incubated with 50 μ g/mL DiI-(VLDL+IDL) at 4 °C for 30 min. After binding, medium was removed, and cells were incubated at 37 °C for 8 h in the absence or presence of DiI-(VLDL+IDL). Cells were then washed in Claycomb-BSA containing 100 U heparin/mL for 15 min at 4 °C with constant shaking. They were then fixed at room temperature for 10 min in PBS containing 3% paraformaldehyde and 2% sucrose before staining with Hoechst 33258 colorant (1:2000) for 10 min, and washed twice with PBS. After DiI-(VLDL+IDL) incubation, several samples were stained with anti-LRP β -chain antibodies (Abcam, Ab92544) to analyze the colocalization of DiI-(VLDL+IDL) and LRP1. In a set of experiments, fixed cells were permeabilized and incubated with antibodies against tropoelastin (Santa Cruz Biotechnology, Inc.; sc-17580) and CatS (Santa Cruz Biotechnology, Inc.; sc-271619) for 1 h. Cultures were then incubated for an additional hour with secondary polyclonal antibodies; anti-goat polyclonal (Molecular Probes, rabbit anti-goat 633) and anti-mouse monoclonal (donkey anti-mouse 488) antibodies.

Samples were analyzed by a laser-scanning confocal fluorescence microscope (Leica TCS NT). The software program used was TCSNT, version 1.3.237 (Leica).

2.2. Physical techniques

HL-1 cell supernatants were centrifuged at 3000 \times g for 5 min at RT to remove lipids not taken up by the cells. The pellet was discarded and the remaining supernatant was freeze-dried and used for supernatant TE physical characterization. Homogenized freeze-dried rat myocardium was used for FTIR/ATR analysis. Results from DSC analysis were not reported because of the low signal of intrinsic transitions due to a weak mass of sample.

2.2.1. Fourier transform infrared analysis (FTIR)

Fourier transform infrared spectroscopy/attenuated total reflectance (FTIR/ATR) spectra were acquired using a Nicolet 5700 FTIR (THERMO FISHER SCIENTIFIC, Waltham, MA) equipped in ATR device with a KBr beam splitter and a MCT/B detector. The ATR accessory used was a Smart Orbit with a type IIA diamond crystal (refractive index 2.4). Spectra were recorded over the region of 4000–450 cm⁻¹ with a spectral resolution of 4 cm⁻¹ and 80 accumulations. Spectral data were collected using Omnic 7.3 (THERMO FISHER SCIENTIFIC, Waltham, MA). A single-beam background spectrum was collected from the clean diamond crystal before each experiment and this background was subtracted from the spectra. Spectra were then subjected to ATR and baseline corrections and normalized in the amide I region. For each type of supernatant or tissue, a mean representative spectrum and its second derivative were computed. Second derivatives were used to enhance the chemical information present in overlapping infrared absorption bands of spectra and to circumvent baseline drifts in infrared spectra. Absorption bands were identified using data on biological tissues, protein and peptides FTIR absorption bands (Yu and Kalnin, 1990; Barth, 2000, 2007; Servaty et al., 2001; Hu et al., 2006; Bonnier et al., 2008; Popescu et al., 2010; Sionkowska et al., 2010; Staniszewska et al., 2014). Supplemental Table S1 lists the position and probable assignments for the bands of the supernatants of control cardiomyocytes.

2.2.2. Thermogravimetric analysis (TGA)

Analyses were performed in alumina pans, with an initial mass of 7 mg, between 25 and 650 °C at 10 °C/min under N₂ atmosphere using a TGA Q50 (TA INSTRUMENTS, New Castle, DE).

2.2.3. Differential scanning calorimetry (DSC)

Analyses were performed using a DSC Pyris calorimeter (PERKIN ELMER, Waltham, MA) The calorimeter was calibrated using Hg and In as standards, resulting in a temperature accuracy of ± 0.1 °C and an enthalpy accuracy of ± 0.2 J/g. Samples, 5 mg in weight, were set into aluminium pans and equilibrated at the initial temperature for 5 min before heating at 20 °C/min. Transition parameters were processed using DSC Pyris calorimeter software.

2.3. Statistical analysis

Quantitative values are shown as means \pm SEM. All experiments were performed with at least three replicates for each group and for at least three independent repeats. Student's *t*-test was used for statistical analysis and a *P*-value of less than 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Biochemical, molecular and cellular results

3.1.1. Biochemical characteristics of TG-CE rich lipoproteins (VLDL+IDL) and agLDL

TG-CE rich lipoproteins (VLDL+IDL) and agLDL differ mainly in CE, TG, PL and apoB content (Table 1). The relation cholesterol: TG

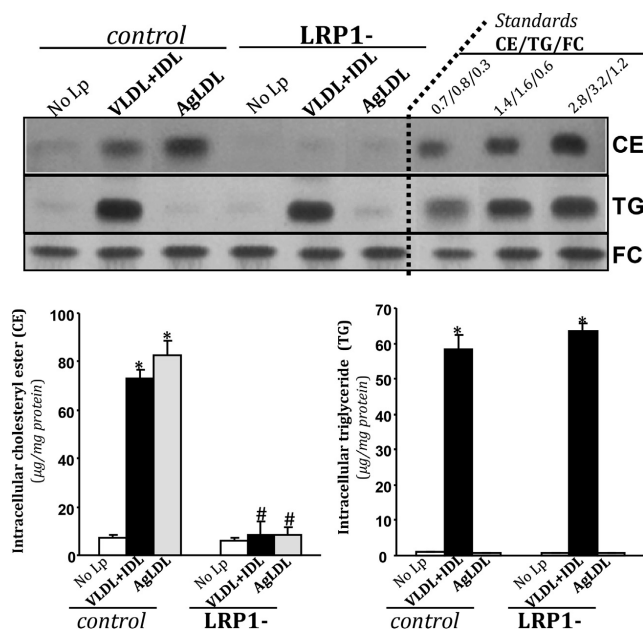


Fig. 1. Effect of VLDL+IDL and AgLDL on intracellular neutral lipid content of control and LRP1 deficient (LRP1⁻) HL-1 cells. Thin layer chromatography showing cholesteryl ester (CE), triglyceride (TG) and free cholesterol (FC) bands and histograms with their quantification. Results are expressed as micrograms per milligram of protein and shown as mean ± SEM of three experiments performed in triplicate. *P < 0.05 vs. cells unexposed to lipoproteins. #P < 0.05 vs. control cells.

Table 1
Relative lipid composition of VLDL+IDL and agLDL.

	Chol	PL	TG	ApoB
VLDL+IDL	3.54 ± 0.03	1.56 ± 0.17	3.33 ± 0.04	0.45 ± 0.00
AgLDL	7.76 ± 1.49	1.93 ± 0.12	1.06 ± 0.18	0.82 g/L

Cholesterol (Chol), phospholipid (PL) and triglyceride (TG) content of lipoproteins was measured in a Cobas c501 autoanalyzer. Results are the mean ± SD of three different samples. Chol, PL and TG are expressed as mM and ApoB as g/L.

is 1:1 for TG-CE rich lipoproteins (VLDL+IDL) and 7:1 for agLDL. As shown in Fig. 1, VLDL+IDL and agLDL caused a differential pattern of intracellular neutral lipid accumulation in HL-1 cardiomyocytes. VLDL+IDL induced a strong intracellular CE and TG accumulation while agLDL exclusively induced intracellular CE accumulation in HL-1 cardiomyocytes. LRP1 deficiency prevented VLDL+IDL- and agLDL-induced intracellular CE accumulation. However, LRP1 deficiency did not exert any significant effect on VLDL+IDL-induced intracellular TG accumulation.

3.1.2. LRP1-mediated cardiomyocyte intracellular CE accumulation increases CatS mature protein levels and alters the structure of TE secretory globules

Western blot analysis showed that VLDL+IDL (1.8 mM Chol) and agLDL (1.8 mM Chol) increased mature CatS protein levels in an LRP1-dependent manner in HL-1 cardiomyocytes (Fig. 2). It has been previously reported that TE aggregates have a characteristic peri-nuclear appearance of secretory pathway components, and that the organization of these aggregates in globules is a required step for elastin organization (Davis and Mecham, 1998; Kozel et al., 2006). Confocal microscopy experiments (Fig. 3) showed that TE was secreted in this globular pattern (asterisks) by HL-1

cardiomyocytes unexposed to lipoproteins (panel a). In contrast, TE globule structure was altered in VLDL+IDL- (panel b) and in agLDL (panel c)-loaded cardiomyocytes. LRP1 deficiency prevented these alterations and rescued the original TE globule structure in cardiomyocytes exposed to VLDL+IDL (panel e) and agLDL (panel f).

3.1.3. CatS mediates the deleterious effect of cardiomyocyte intracellular CE accumulation on TE globule structure

As shown in Fig. 4, CatS silencing prevented the alterations of TE globule structure induced by VLDL+IDL- (panel b) and agLDL (panel c)-loading of cardiomyocytes and rescued the original TE globule structure in VLDL (panel e) and agLDL (panel f)-loaded cells. These results indicate that cardiomyocyte intracellular CE accumulation induces structural alterations in TE through the upregulation of CatS mature protein levels.

3.2. Physical results

3.2.1. Physical characteristics of HL-1 cardiomyocyte supernatants

The classical absorption bands of proteins (amide A, amide I, II, III) were found on the spectra of control, LRP1- and CatS-cardiomyocytes, and their positions were very close to the absorption bands of the supernatant from hVSMC (superimposed on Fig. S1A and S1B) mainly constituted of tropoelastin (Samouillan et al., 2012). The main difference with pure tropoelastin concerned the broad band located at 1591 cm⁻¹ on the global spectra of all supernatants (Fig. S1B). Position and probable bands assignments of the supernatants from control cardiomyocytes are listed in Table S1.

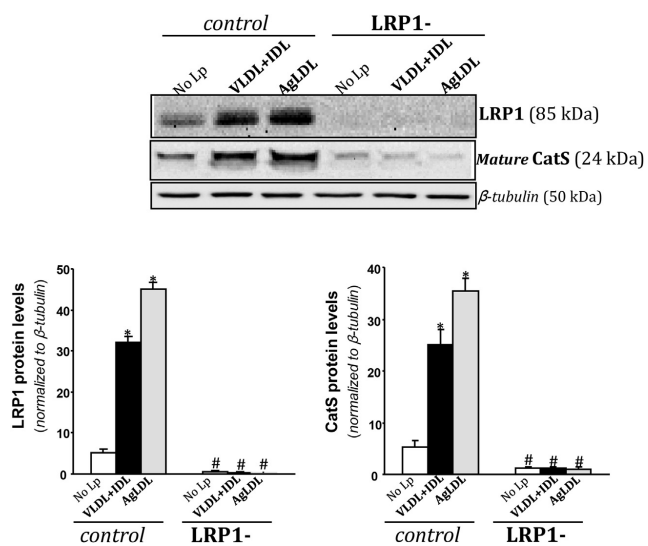


Fig. 2. Effect of VLDL + IDL and AgLDL on LRP1 and CatS protein levels of control and LRP1 deficient (LRP1⁻) HL-1 cells. Representative Western blot analysis showing LRP1 and mature CatS protein levels in control and LRP1-cells. Bar graphs showing the quantification of LRP1 and CatS normalized by β -tubulin bands. Results are expressed as arbitrary units and shown as mean \pm SEM of three experiments performed in triplicate. * P < 0.05 vs. cells unexposed to lipoproteins. # P < 0.05 vs. control cells.

The comparison of the second derivative spectra in the amide I/amide II (Fig. 5A), which are sensitive to secondary structures, confirmed the close correlation between the chemical composition of cardiomyocyte and hVSMC supernatants. Spectral

supernatant signature was similar in HL-1 cardiomyocytes, hVSMC and elastic tissues that have the main minima of the amide I at 1694 cm^{-1} (anti-parallel β sheets), 1684 cm^{-1} (anti-parallel β sheets and β turns), 1669 cm^{-1} (undefined or β turns), 1652 cm^{-1}

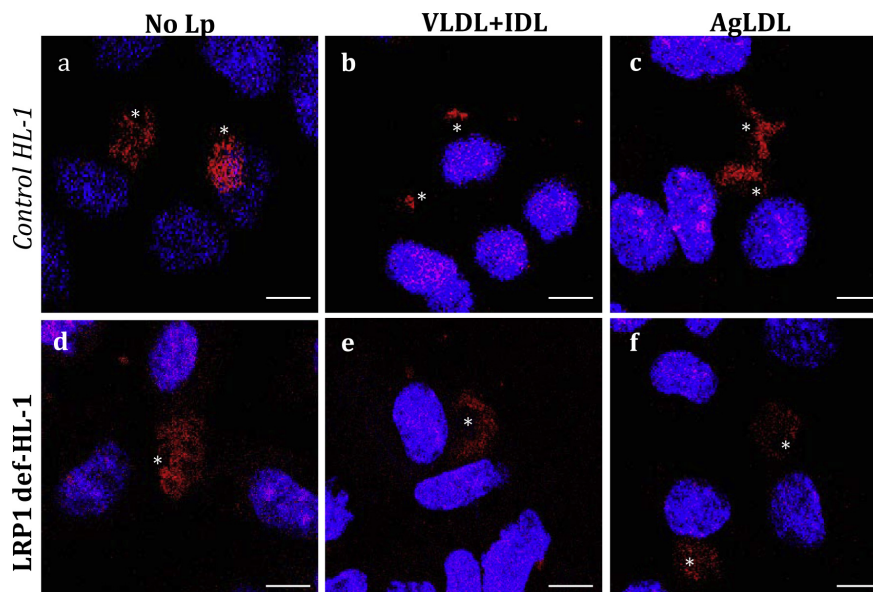


Fig. 3. Effect of VLDL + IDL and AgLDL on tropoelastin (TE) in control and LRP1 deficient (LRP1⁻) HL-1 cells. Representative confocal microscopy images showing the globular structure of TE (in red) synthesized and secreted by HL-1 cardiomyocytes. Asterisks show TE structures. Nuclei are in blue. Bar scale: 10 μm (For interpretation of the color information in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.).

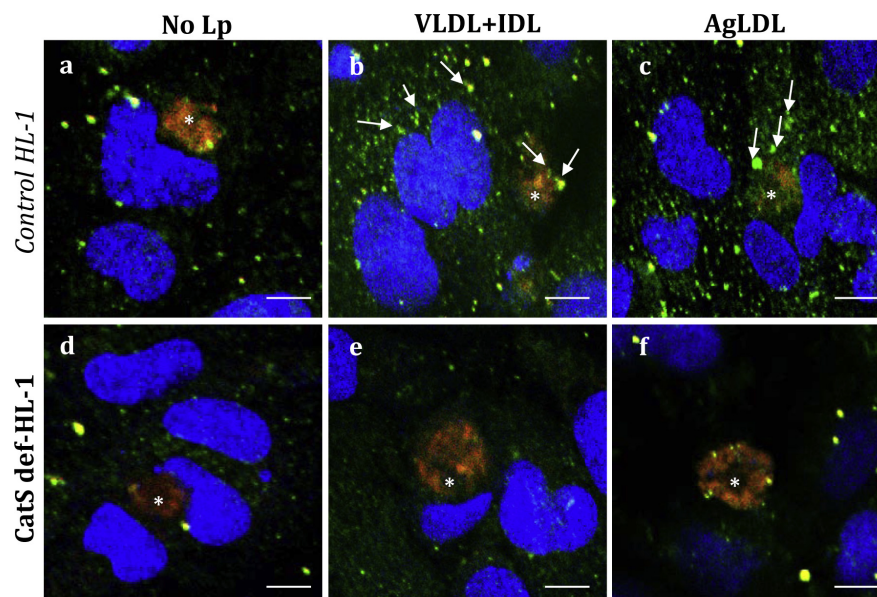


Fig. 4. Effect of VLDL+IDL and AgLDL on tropoelastin (TE) in control and CatS deficient (CatS⁻) HL-1 cells. Representative confocal microscopy images showing CatS (in green) and TE (in red) in HL-1 cardiomyocytes. Asterisks show TE structures and arrows CatS staining. Nuclei are in blue. Bar scale: 10 μ m (For interpretation of the color information in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article).

(α helices), 1636 cm^{-1} (hydrated water/intramolecular β sheets) and 1617 cm^{-1} (β turns) and the main minima of the amide II at 1559 (β sheets), 1542 cm^{-1} (unordered or α helices) and 1516 cm^{-1} (anti parallel β sheets) (Debelle et al., 1995; Herberhold and Winter, 2002; Bonnier et al., 2006; Pluot et al., 2007; Staniszewska et al., 2014). The presence of these secondary structures was confirmed by the Amide III analysis (not shown) presenting main minima at 1317 cm^{-1} (α helices), 1258 cm^{-1} , 1221 cm^{-1} (β sheets) and 1280 cm^{-1} (random). The main difference with pure tropoelastin concerned the associated minima on the second derivative in the same wavenumber range (Fig. 5A), which can be attributed to glycoaminoglycans, free amino acids and/or proteins rich in His, Phe, His and Gln. The second derivative spectra of control cardiomyocytes in the 3000–2800 cm^{-1} (Fig. 5B) corresponded to the region of asymmetric and symmetric vibrations of methyl and methylene groups (mainly from Gly, Pro, Val, Ala, Leu) of proteins. In control supernatants, the more visible minimum at 2931 cm^{-1} corresponded to asymmetric CH_2 stretching.

Thermogravimetric (TG) and temperature/derivative (DTG) plots of purified supernatants from control and VLDL-loaded mice cardiomyocytes are shown in Fig. S2. Since this technique is very mass-consuming, we first performed it only in control cardiomyocytes to set the limits of DSC analyses (below the degradation temperature) and to detect eventual evolution of the degradation process with lipid-loading. The global trend of the two TG plots corresponded to the classical thermal behavior of freeze-dried proteins (Puett et al., 1967; Samouillan et al., 1999). The first stage (between 25 and 100 $^{\circ}\text{C}$) is connected with the evaporation of water absorbed to the protein, while the second stage is associated with a multi-step stage corresponding to the degradation of the sample, namely a deamination and a depolymerization arising from the breaking of polypeptide bonds. It is noteworthy that these two fractions begin to degrade at 100 $^{\circ}\text{C}$ (with the presence of well-marked

peaks on the derivative DTG curves in the 100–220 $^{\circ}\text{C}$ zone), in contrast with the supernatant from hVSMC mainly constituted of tropoelastin (superimposed in Fig. S2) that remains stable up to 250 $^{\circ}\text{C}$, as usually observed in elastin fractions (Samouillan et al., 1999, 2012). This multiple degradation processes in the 100–220 $^{\circ}\text{C}$ was indicative of the presence of less stable components than tropoelastin in cardiomyocyte supernatants, corroborating FTIR results. In our previous study on the thermal degradation of hVSMC supernatants, the two degradations peaks at 313 and 335 $^{\circ}\text{C}$ were attributed to non-aggregated and aggregated tropoelastin, respectively. In the present study, only subsist in this temperature zone the degradation peak associated with non-aggregated tropoelastin, occurring between 311 and 313 $^{\circ}\text{C}$ for the two fractions.

As shown in Fig. 6, two major glass transitions were observed in control HL-1 cardiomyocyte supernatants as a step of the heat flow. The glass transition mean temperatures T_g determined from a statistical analysis are reported in Fig. 7. The presence of two glass transitions was indicative of two kinds of amorphous phases in the purified supernatants. According to literature data on the calorimetric and mechanical properties of proteins of the extracellular matrix and tissues (Hoeve and Flory, 1974; Samouillan et al., 1999; Lillie and Gosline, 2002a, 2002b; Hu et al., 2010; Panagopoulou et al., 2013), the presence of a glass transition in the 30–200 $^{\circ}\text{C}$ range (related to the hydration state and micro-environment) is generally associated with the signature of elastin or gelatin (denatured collagen). This thermal event, addressed to the amorphous, unordered zones of polymers and biopolymers, characterizes the zone of viscoelasticity of materials. Elastin does not possess a long range order, and although different secondary conformations can be found in this protein, it can be considered as amorphous for the physical structure, which is in good agreement with the Tamburro's model on labile, dynamic β turns in hydrophobic domains (Debelle and Tamburro, 1999; Tamburro et al., 2006) and the Daggett's model

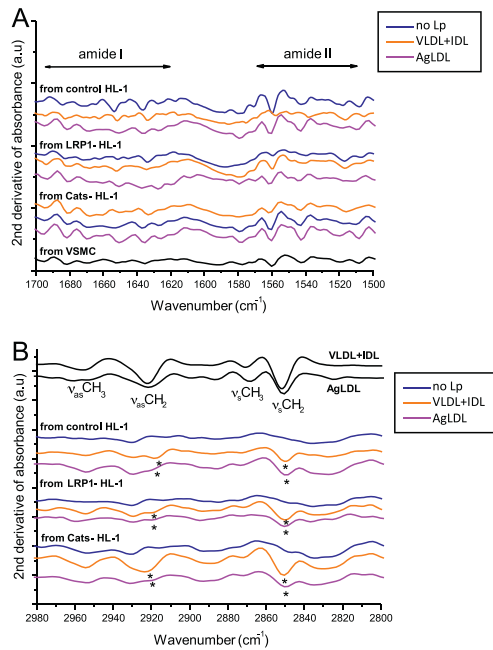


Fig. 5. Effect of VLDL+IDL and AgLDL on the second derivative FTIR spectra of control and LRP1 deficient (LRP1⁻) HL-1 cells. Second derivative FTIR spectra in the 1700–1500 cm⁻¹ zone (A) and in the 3000–2800 cm⁻¹ zone (B). Thin lines: VLDL+IDL, AgLDL and supernatants from VSMC; bold lines: supernatants from the different sets of HL-1 cardiomyocytes. Asterisks label the vibrations that are specific of methylene groups present in lipoproteins.

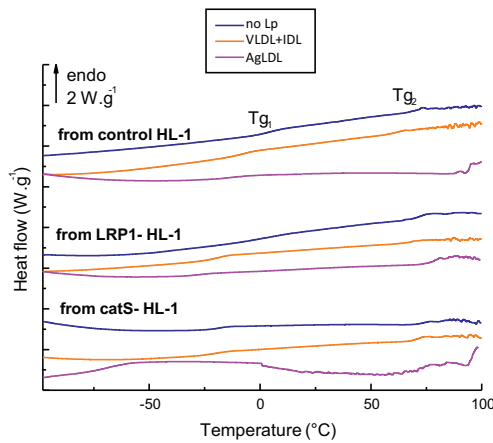


Fig. 6. Effect of VLDL+IDL and AgLDL on DSC thermograms of supernatants from control, LRP1 deficient (LRP1⁻) and CatS deficient (CatS⁻) HL-1 cells. Differential Scanning calorimetry thermograms of VLDL+IDL, AgLDL and supernatants from the different sets of HL-1 cardiomyocytes. Pseudo-second-order transitions are marked as Tg1 and Tg2.

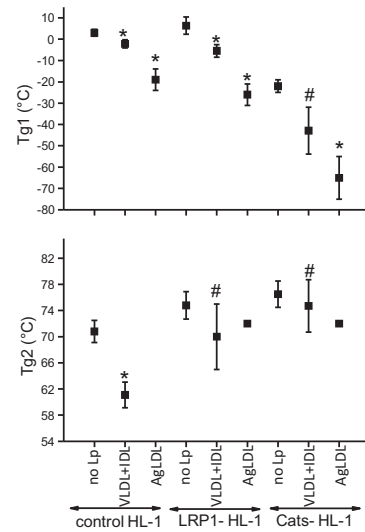


Fig. 7. Effect of VLDL+IDL and AgLDL on glass transition temperatures of supernatants from control, LRP1 deficient (LRP1⁻) and CatS deficient (CatS⁻) HL-1 cells. Glass transition temperatures (Tg1 and Tg2) from DSC analysis of the purified supernatants from the different sets of HL-1 cardiomyocytes. **P* < 0.05 vs. cells unexposed to lipoproteins. #*P* < 0.05 vs. control cells.

(Li, 2002) that describes hydrophobic domains of elastin as compact amorphous structures. According to previous work on supernatants from hVSMC (Samouillan et al., 2012), the higher glass transition Tg2 recorded at 68 °C for supernatants from control cardiomyocytes can be thus attributed to non-aggregated tropoelastin. The presence of a second, lower glass transition temperature Tg1 recorded at 4 °C for supernatants from control cardiomyocytes attests to a phase segregation in the supernatants, and although its origin is unclear it could be tentatively assigned to flexible macromolecules like glycosaminoglycans, or low molecular weight polypeptides.

3.2.2. Physical characteristics of TG-CE rich lipoproteins (VLDL+IDL) and agLDL

The pure VLDL+IDL and agLDL FTIR spectra superimposed on supplemental Figs. S1A and Fig. S1B fit well with literature data showing specific absorption of the carbonyl stretching of ester bond at 1743 and 1737 cm⁻¹, respectively. This spectra has been attributed to phospholipids, unsaturated triglycerides and cholesteryl esters (Nara et al., 2002; Krilov et al., 2009). The shift of 6 cm⁻¹ between VLDL+IDL and agLDL has been ascribed to the difference in the surroundings and dynamics of carbonyl groups (Nara et al., 2002), due to the distinct chemical composition and packing of these lipoproteins. The thermogram of VLDL+IDL; was characterized by an exothermic first order transition at -70 °C, that can be ascribed to a crystallization phenomenon, followed by two endothermic first order transitions at 24.5 and -1 °C, respectively, corresponding to the order-disorder transitions of triglycerides exhibiting polymorphic behaviour as already noted in literature data (Hale and Schroeder, 1981; Prassl et al., 1995). The calorimetric signature of agLDL (supplemental Fig. S3) was completely distinct from the VLDL+IDL one, with a glass transition at Tg = -33 °C, ascribed to the amorphous phase of agLDL, and a single order-disorder transition at 38 °C. These data highlight the extreme difference between the physical structure of VLDL+IDL and agLDL.

3.2.3. Cardiomyocyte intracellular CE accumulation reduces TE Tg2 glass transition temperature in LRP1- and CatS-dependent manner

VLDL+IDL- and agLDL-loading of control cardiomyocytes decreases the TE Tg2 glass transition temperature in a significant manner ($p=0.00375$) (Fig. 7). It must be pointed out that the glass transition Tg2 of supernatants from agLDL-loaded cardiomyocytes was not detected, indicating a dramatic effect of agLDL on TE physical structure. However, LRP1-deficiency prevented this down-regulatory effect of VLDL and agLDL on TE Tg2 glass transition. Despite of the fact that variability is high, these results indicate that LRP1 plays a crucial role in the deleterious effect of VLDL and agLDL on TE Tg2 glass transition. It was not possible to achieve statistical analysis with results obtained in agLDL-loaded cardiomyocytes since the degradation process can induce erroneous values.

CatS silencing also prevented the downregulatory effect of VLDL and agLDL on TE Tg2 glass temperature (Figs. 6 and 7). These results indicate that cardiomyocyte intracellular CE accumulation induces physical alterations in TE through the upregulation of CatS mature protein levels.

3.2.4. Exogenous non-internalized VLDL +IDL and agLDL cause alterations in cardiomyocyte tropoelastin physical characteristics in an LRP1 and CatS-independent manner

As observed in the FTIR second derivative spectra of Fig. 5A, VLDL+IDL and agLDL did not induce differences in the main minima of supernatants, indicating that VLDL+IDL and agLDL did not alter cardiomyocyte TE secondary structure. Nevertheless, the complexity of the supernatant spectra makes difficult to use the decomposition of amide I as a method to identify modifications in the amount of α helices, β sheets- β turns and unordered structures induced by exogenous lipids. In the 1780–1700 cm^{-1} spectra enlarged zone (supplemental Fig. S1C) there was a shoulder located at 1740 cm^{-1} in supernatants from VLDL and agLDL-exposed cardiomyocytes. This shoulder remained in LRP1- and CatS-deficient HL-1 cardiomyocytes, and reflected the presence of interacting lipids from VLDL and agLDL. The footprint of interacting exogenous lipids was also observed on the 3000–2800 cm^{-1} second derivative zone region (Fig. 5B) corresponding to vibrations of methyl and methylene groups. The specific signature of methylene groups in lipoproteins was detected at 2920 and 2850 cm^{-1} (asterisk). DSC measurements (Figs. 6 and 7) showed that the glass transition temperature, Tg1, ascribed to the softer phase – but not associated with native TE – was drastically decreased in HL-1 cardiomyocytes exposed to VLDL and even more so in those exposed to agLDL, in an LRP1 and CatS-independent manner.

3.3. In vivo results

We have tested the relevance of some of the *in vitro* findings in an *in vivo* model of diabetes. As shown in supplemental Fig. S4, there was a significant accumulation of neutral lipids (both CE and TG) in the myocardium of diabetic compared to control rats (Fig. S4A). Western blot analysis showed that both myocardial LRP1 and CatS mature protein levels were strongly higher in diabetic rats versus control rats (Fig. S4B). Finally, FTIR analysis showing the comparison of the second derivative FTIR spectra in the amide I/amide II zone (sensitive to secondary structures) evidenced some significant and reproducible differences between heart tissue from control and diabetic rats (analyses performed in triplicate) (Fig. S5). The minima positions reported in supplemental Table S2 fit with collagen and elastin minima as well as with cardiovascular tissues. In heart tissues from diabetic rats, the vanishing of the bands at 1643 and 1537 cm^{-1} can be associated with the lack of unordered structures. This could be associated with an alteration of elastin. Moreover, the slight shift of the bands at 1631 and 1547 cm^{-1} (β

sheets) towards low wave number is ascribed to the enhancement of hydrogen bonding that could be due to an aggregation phenomenon. These results indicate that elastin in the heart of diabetic rats lost part of its characteristic random structure associated with entropic elasticity.

4. Discussion

This study shows that intracellular CE accumulation derived from TG-CE rich lipoproteins (VLDL+IDL) and agLDL raises CatS mature protein levels, alters the structure of intracellular tropoelastin globules and the physical characteristics of cardiomyocyte secreted tropoelastin. It also indicates that by impairing cardiomyocyte intracellular CE accumulation and CatS increase, LRP1 deficiency prevents physical alterations that make elastin prone to rupture. Our results suggest that cholesterol ester-loaded cardiomyocytes induce physical alterations in myocardial tropoelastin that make elastin prone to rupture and that LRP1 is a crucial receptor in this process.

Our data consistently demonstrate that intracellular CE accumulation is one of the main intracellular neutral lipids modulating the physical characteristics of cardiomyocyte-secreted tropoelastin. First, we observed that VLDL+IDL, composed of CE and TG, and agLDL, composed of CE, exerted similar deleterious effects on CatS mature levels, TE structure and physical characteristics. Second, we found that these deleterious effects were LRP1 dependent. Previous studies from different groups including ours have demonstrated that LRP1 participates in the selective uptake of cholesterol esters from lipoproteins (Swarnakar et al., 2001; Vassiliou and McPherson, 2004; Llorente-Cortés et al., 2006; Cal et al., 2012). LRP1-mediated CE selective uptake is a mechanism highly favoured by the capacity of LRP1 to interact with proteoglycans and lipases (Swarnakar et al., 2001; Nielsen et al., 1997), molecules that strongly facilitate CE selective uptake by promoting lipoprotein retention and modification (Sartipy et al., 1999; Kadowaki et al., 1992; Seo et al., 2000). Remarkably, CE and TG are taken up through different mechanisms in cardiomyocytes. While CE accumulation respond to VLDL-CE uptake through LRP1-mediated selective uptake (Cal et al., 2012), triglyceride accumulation responds to whole lipoprotein uptake through VLDLR and/or FA uptake through different FA transporters (Goldberg et al., 2011).

We emphasize that in the present study, we used TG-CE rich lipoproteins at enhanced concentrations. As these concentrations are characteristic of insulin resistance and combined hyperlipoproteinemia states, these lipoproteins may cause myocardial CE content and associated cardiac alterations in patients with these pathologies. Small lipoproteins enriched in CE and large lipoproteins enriched in TG potentially increase intracellular CE content. It is of note that not only the lipid composition but also lipoproteins size and protein composition may influence lipoprotein biological effects. It is also important to emphasize that fibroblasts, considered the main cellular type responsible for TE production in the heart (Eghbali, 1992), have a strong capacity to take up lipoproteins (Llorente-Cortés et al., 2002). This mechanism may thus be highly relevant for alterations in fibroblast secreted TE and cardiac remodeling. Our results also show that cardiomyocyte intracellular CE accumulation exerted deleterious effect of TE structure and physical characteristics through upregulation of CatS mature levels. CatS, like other cysteine proteases, is expressed as inactive proenzyme that undergoes activation by the cleavage of the pro-domain under acidic conditions (Bromme, 2004). Exceptionally, CatS, remains catalytically active under neutral pH and remains stable outside the lysosome. Like CatB and CatL, CatS undergoes autoactivation (Pungercar et al., 2009). Interestingly, glycosaminoglycans promote the autocatalytic processing of

cathepsins to their mature forms (Caglic et al., 2007). Glycosaminoglycan structure depends on hyaluronan synthase (HAS), a unique membrane-associated glycosyltransferase whose activity is modulated by membrane cholesterol composition (Ontong et al., 2014). The culture of human dermal fibroblasts in lipoprotein-depleted medium seems to attenuate the synthesis of hyaluronan. Therefore, in our *in vitro* system, intracellular CE accumulation could increase HAS activity and hyaluronan content. High levels of glycosaminoglycans would induce the autocatalytic processing of CatS to their mature forms. This mechanism could explain why we exclusively detect the mature form of CatS in VLDL + IDL- and agLDL-loaded HL-1 cardiomyocytes. Further studies are required to know whether this mechanism plays a role in the activation of CatS by intracellular CE accumulation in HL-1 cardiomyocytes. The upregulatory effect of intracellular CE accumulation on CatS mature protein levels in cardiomyocytes has been previously shown in human VSMC (Samouillan et al., 2012) and macrophages (Burns-Kurtis et al., 2004). According to our results, CatS actively participates in the deleterious effect of VLDL + IDL and agLDL on tropoelastin globule structure. We show that VLDL + IDL and agLDL clearly altered the pattern of cardiomyocyte TE secretion and that CatS deficiency rescues the original TE globule structure. CatS effects on TE secretion are likely related to the capacity of this protease to control the trafficking and flow of certain proteins to the cell surface (Driessen et al., 1999). Our results support the theory about the possible active role of intracellular cathepsins in a process called “subcellular remodelling”, already described in congestive heart failure (Dhalla et al., 2009).

DSC thermograms of supernatants showed that intracellular CE accumulation also influenced the physical characteristics of secreted TE. In particular, it caused a strong reduction of glass transition temperature Tg2, attributed to non-aggregated tropoelastin. According to the free volume theory, this plasticization phenomenon can be due to the insertion of compatible low molecular weight molecules or to the fragmentation of the main chain producing more end chains and thus increasing the free volume (Ferry, 1980). According to our physical data, this plasticization is due to the partial degradation of the tropoelastin chain. VLDL + IDL and agLDL did not cause this plasticization effect in LRP1- and CatS-deficient cardiomyocytes, which have normal TE globular structure. We thus propose that TE plasticization could be the result, at least in part, of CatS-induced structural alterations of intracellular TE globules. TE plasticization contributes to TE fragmentation and formation of elastin-derived peptides. Elastin-derived peptides reportedly increase atherosclerosis (Gayral et al., 2014) and modulate insulin-resistance (Blaise et al., 2013) in *in vivo* models. Additionally, CatS, a key player in this process, has been reportedly involved in ECM remodeling associated with dilated (Ge et al., 2006), ischemic (Sun et al., 2011) and hypertensive cardiomyopathy (Cheng et al., 2006; Díez, 2010). Our results from the *in vivo* model of diabetes showed that LRP1 and mature CatS protein levels were strongly increased in the myocardium of diabetic rats compared to controls. Moreover, we also found a strong myocardial cholesterol ester accumulation in the myocardium of diabetic rats. Additionally, FTIR/AVR indicates that elastin in the heart of diabetic rats lost part of its characteristic random structure associated with entropic elasticity. Taken together, these results suggests that myocardial CE accumulation in the diabetic heart, by increasing CatS mature protein levels, may contribute to adverse myocardial remodelling in diabetes.

Besides these TE physical alterations induced by intracellular CE accumulation, we observed alterations both in lipoproteins and ECM that are independent on cellular CE uptake. These alterations are likely facilitated by a close interaction between lipoproteins and ECM. FTIR analysis indicates that a weak fraction of lipids remains after the purification of supernatants. The absence of the

thermal transitions of pure VLDL + IDL or agLDL in the thermograms of the supernatants from VLDL + IDL- and agLDL-exposed cardiomyocytes suggests a modification of the physical structure of these lipoproteins, associated with their interaction with cellular or supernatant components, as previously reported for several lipoproteins and elastic materials (Podet et al., 1991; Lillie and Gosline, 2002a; Samouillan et al., 2012). This interaction between lipoproteins and cell/supernatant components could also explain the decrease of the Tg1 glass transition in VLDL and agLDL-exposed cardiomyocytes. Apart from the hydration effects, the presence of the lipid molecules inside the biological network would itself increase the network free volume, providing some direct plasticization (Lillie and Gosline, 2002a). A similar decrease in the glass transition temperature Tg1 associated with non-aggregated tropoelastin has been previously observed in supernatants of human VSMC exposed to modified lipoproteins (Samouillan et al., 2012). Tg1 decrease may be also associated to modifications of the physical structure of the elastic material, although, according to our results, this physical alteration is LRP1- and CatS-independent.

In summary, lipoprotein-derived neutral lipids influence physical characteristics of tropoelastin at both an intracellular and extracellular level. At the intracellular level, cholesteryl esters alter tropoelastin physical characteristics and promote tropoelastin fragmentation by increasing mature CatS protein levels.

Sources of funding

This work was funded by FIS PI11/00747 from Instituto Salud Carlos III, co-financed by the European Fund for Regional Development (E.F.R.D.) and by Red de Investigación Cardiovascular–RIC (RD RD12/0042/0027). V.L.L.-C. and L.B. are members of the Quality Research Groups from Generalitat de Catalunya 2014-SGR-170 and 2009-SGR-826, respectively.

Acknowledgements

The authors thank Dra. Esther Peña (Cardiovascular Research Center, CSIC-ICCC) by her technical help with confocal microscopy experiments and Carolyn Newey (IIB Sant Pau) for editorial assistance.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiocel.2014.09.005>.

References

- Augier T, Charpiot P, Chareyre C, Remusat M, Rolland PH, Garçon D. Medial elastic structure alterations in atherosclerotic arteries in minipigs: plaque proximity and arterial site specificity. *Matrix Biol* 1997;15(7):455–67.
- Barth A. The infrared absorption of amino acid side chains. *Prog Biophys Mol Biol* 2000;74(3–5):141–73.
- Barth A. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochim Biophys Acta* 2007;1767(9):1073–101.
- Blaise S, Romier B, Kawecky C, Ghirardi M, Rabenoelina F, Baud S, et al. Elastin-derived peptides are new regulators of insulin resistance development in mice. *Diabetes* 2013;62(11):3807–16.
- Bonnier F, Rubin S, Ventéo L, Krishna CM, Pluot M, Baehrel B, et al. In-vitro analysis of normal and aneurismal human ascending aortic tissues using FT-IR microspectroscopy. *Biochim Biophys Acta* 2006;1758(7):968–73.
- Bonnier F, Rubin S, Debelle L, Ventéo L, Pluot M, Baehrel B, et al. FTIR protein secondary structure analysis of human ascending aortic tissues. *J Biophoton* 2008;1(3):204–14.
- Bromme D. Production and activation of recombinant papain-like cysteine proteases. *Methods* 2004;32(2):199–206.
- Burns-Kurtis CL, Olzinski AR, Needle S, Fox JH, Capper EA, Kelly FM, et al. Cathepsin S expression is up-regulated following balloon angioplasty in the hypercholesterolemic rabbit. *Cardiovasc Res* 2004;62(3):610–20.

- Caglic D, Pungercar JR, Pejler G, Turk V, Turk B. Glycosaminoglycans facilitate procathepsin B activation through disruption of propeptide-mature enzyme interactions. *J Biol Chem* 2007;282(45):33076–85.
- Cal R, Castellano J, Revuelta-López E, Aledo R, Barriga M, Farré J, et al. Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 mediates hypoxia-induced very low density lipoprotein-cholesterol ester uptake and accumulation in cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 2012;94(3):469–79.
- Cheng XW, Obata K, Kuzuya M, Izawa H, Nakamura K, Asai E, et al. Elastolytic cathepsin induction/activation system exists in myocardium and is upregulated in hypertensive heart failure. *Hypertension* 2006;48(5):979–87.
- Claycomb WC, Lanson NA, Stallworth BS, Egeland DB, Delcarpio JB, Bahinski A, et al. HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(6):2979–84.
- Davis EC, Mecham RP. Intracellular trafficking of tropoelastin. *Matrix Biol* 1998;17(4):245–54.
- Debelle L, Alix AJ, Jacob MP, Huvenne JP, Berjot M, Sombret B, et al. Bovine elastin and kappa-elastin secondary structure determination by optical spectroscopies. *J Biol Chem* 1995;270(44):26099–103.
- Debelle L, Tamburro AM. Elastin: molecular description and function. *Int J Biochem Cell Biol* 1999;31(2):261–72.
- Dhalla NS, Saini-Chohan HK, Rodriguez-Leyva D, Elimban V, Dent MR, Tappia PS. Subcellular remodelling may induce cardiac dysfunction in congestive heart failure. *Cardiovasc Res* 2009;81(3):429–38.
- Diez J. Altered degradation of extracellular matrix in myocardial remodelling: the growing role of cathepsins and cystatins. *Cardiovasc Res* 2010;87(4):591–2.
- Drissen C, Bryant RA, Lennon-Duménil AM, Villadangos JA, Bryant PW, Shi GP, et al. Cathepsin S controls the trafficking and maturation of MHC class II molecules in dendritic cells. *J Cell Biol* 1999;147(4):775–90.
- Eghbali M. Cardiac fibroblasts: function, regulation of gene expression, and phenotypic modulation. *Basic Res Cardiol* 1992;87(Suppl 2):183–9.
- Ferry JD. Viscoelastic properties of polymers. 3rd ed Wiley; 1980.
- Floquet N, Héry-Huynh S, Dauchez M, Derreumaux P, Tamburro AM, Alix AJ. Structural characterization of VGVAPG, an elastin-derived peptide. *Biopolymers* 2004;76(3):266–80.
- Fomovsky GM, Thomopoulos S, Holmes JW. Contribution of extracellular matrix to the mechanical properties of the heart. *J Mol Cell Cardiol* 2010;48(3):490–6.
- Foster JA, Rubin L, Kagan HM, Franzblau C, Bruenger E, Sandberg LB. Isolation and characterization of cross-linked peptides from elastin. *J Biol Chem* 1974;249(19):6191–6.
- Fulop T, Khalil A, Larbi A. The role of elastin peptides in modulating the immune response in aging and age-related diseases. *Pathol Biol* 2012;60(1):28–33.
- Gayral S, Garnotel R, Castaing-Berthou A, Blaise S, Fougerat A, Berge E, et al. Elastin-derived peptides potentiate atherosclerosis through the immune Neu1-PI3K pathway. *Cardiovasc Res* 2014;102(1):118–27.
- Ge J, Zhao G, Chen R, Li S, Wang S, Zhang X, et al. Enhanced myocardial cathepsin B expression in patients with dilated cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail* 2006;8(3):284–9.
- Goldberg IJ. Clinical review 124: diabetic dyslipidemia: causes and consequences. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(3):965–71.
- Goldberg IJ, Eckel RH, McPherson R. Triglycerides and heart disease: still a hypothesis? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;31(8):1716–25.
- Granér M, Siren R, Nyman K, Lundbom J, Hakkarainen A, Pentikäinen MO, et al. Cardiac steatosis associates with visceral obesity in nondiabetic obese men. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98(3):1189–97.
- Gupta V, Grande-Alen KJ. Effects of static and cyclic loading in regulating extracellular matrix synthesis by cardiovascular cells. *Cardiovasc Res* 2006;72(3):375–83.
- Hale JE, Schroeder F. Differential scanning calorimetry and fluorescence probe investigations of very low density lipoprotein from the isolated perfused rat liver. *J Lipid Res* 1981;22(5):838–51.
- Hayden MR, Chowdhury N, Govindarajan G, Karuparthi PR, Habibi J, Sowers JR. Myocardial myocyte remodeling and fibrosis in the cardiometabolic syndrome. *J Cardiometab Syndr* 2006;1(5):326–33.
- Henderson BC, Sen U, Reynolds C, Moshal KS, Ovechkin A, Tyagi N, et al. Reversal of systemic hypertension-associated cardiac remodeling in chronic pressure overload myocardium by ciglitazone. *Int J Biol Sci* 2007;3(6):385–92.
- Herberhold H, Winter R. Temperature- and pressure-induced unfolding and refolding of ubiquitin: a static and kinetic Fourier transform infrared spectroscopy study. *Biochemistry* 2002;41(7):2396–401.
- Hoewe CA, Flory PJ. The elastic properties of elastin. *Biopolymers* 1974;13(4):677–86.
- Hu X, Kaplan D, Cebe P. Determining beta-sheet crystallinity in fibrous proteins by thermal analysis and infrared spectroscopy. *Macromolecules* 2006;39(18):6161–70.
- Hu X, Wang X, Rnjak J, Weiss AS, Kaplan DL. Biomaterials derived from silk-tropoelastin protein systems. *Biomaterials* 2010;31(32):8121–31.
- Jarauta E, Mateo-Gallego R, Gilabert R, Plana N, Junyent M, de Groot E, et al. Carotid atherosclerosis and lipoprotein particle subclasses in familial hypercholesterolemia and familial combined hyperlipidaemia. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2012;22(7):591–7.
- Kadowaki H, Patton GM, Robins SJ. Metabolism of high density lipoprotein lipids by the rat liver: evidence for participation of hepatic lipase in the uptake of cholesteryl ester. *J Lipid Res* 1992;33(11):1689–98.
- Kozel BA, Rongish BJ, Czirok A, Zach J, Little CD, Davis EC, et al. Elastic fiber formation: a dynamic view of extracellular matrix assembly using timer reporters. *J Cell Physiol* 2006;207(1):87–96.
- Krilov D, Balarin M, Kosović M, Gamulin O, Brnjac-Kraljević J. FT-IR spectroscopy of lipoproteins—a comparative study. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2009;73(4):701–6.
- Li B, Daggett V. Molecular basis for the extensibility of elastin. *J Muscle Res Cell Motil* 2002;23(5–6):561–73.
- Li B, Alonso DOV, Daggett V. Stabilization of globular proteins via introduction of temperature-activated elastin-based switches. *Structure* 2002;10(7):989–98.
- Lillie MA, Gosline JM. Effects of lipids on elastin's viscoelastic properties. *Biopolymers* 2002a;64(3):127–38.
- Lillie MA, Gosline JM. The viscoelastic basis for the tensile strength of elastin. *Int J Biol Macromol* 2002b;30(2):119–27.
- Llorente-Cortés V, Otero-Viñas M, Badimon L. Differential role of heparan sulfate proteoglycans on aggregated LDL uptake in human vascular smooth muscle cells and mouse embryonic fibroblasts. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22(11):1905–11.
- Llorente-Cortés V, Otero-Viñas M, Camino-López S, Costales P, Badimon L. Cholesteryl esters of aggregated LDL are internalized by selective uptake in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26(1):117–23.
- Llorente-Cortés V, Otero-Viñas M, Camino-López S, Llampayas O, Badimon L. Aggregated low-density lipoprotein uptake induces membrane tissue factor procoagulant activity and microparticle release in human vascular smooth muscle cells. *Circulation* 2004;110(4):452–9.
- Mecham RP. Introduction: catalyzing matrix stability. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1991;5(3):205.
- Nara M, Okazaki M, Kagi H. Infrared study of human serum very-low-density and low-density lipoproteins. Implication of esterified lipid C=O stretching bands for characterizing lipoproteins. *Chem Phys Lipids* 2002;117(1–2):1–6.
- Nielsen MS, Brejnning J, García R, Zhang H, Hayden MR, Vilaró S, et al. Segments in the C-terminal folding domain of lipoprotein lipase important for binding to the low density lipoprotein receptor-related protein and to heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem* 1997;272(9):5821–7.
- O'Rourke M. Arterial aging: pathophysiological principles. *Vasc Med* 2007;12(7):329–41.
- Obermajer N, Jevnikar Z, Doljak B, Kos J. Role of cysteine cathepsins in matrix degradation and cell signalling. *Connect Tissue Res* 2008;49(3):193–6.
- Ontong P, Hatada Y, Taniguchi S, Kakizaki I, Itano N. Effect of a cholesterol-rich lipid environment on the enzymatic activity of reconstituted hyaluronan synthase. *Biochem Biophys Res Commun* 2014;443(2):666–71.
- Panagopoulou A, Kyritsis A, Vodina M, Pissis P. Dynamics of uncrystallized water and protein in hydrated elastin studied by thermal and dielectric techniques. *Biochem Biophys Acta* 2013;1834(6):977–88.
- Pillutla P, Hwang YC, Augustus A, Yokoyama M, Yagyu H, Johnston TP, et al. Perfusion of hearts with triglyceride-rich particles reproduces the metabolic abnormalities in lipotoxic cardiomyopathy. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005;288(6):E1229–35.
- Pluot M, Baehrel B, Manfait M, Rubin S, Bonnier F, Sandt C, et al. Analysis of structural changes in normal and aneurismal human aortic tissues using FTIR microscopy. *Biopolymers* 2007;89(2):160–9.
- Podet EJ, Shaffer DR, Gianturco SH, Bradley WA, Yang CY, Guyton JR. Interaction of low density lipoproteins with human aortic elastin. *Arterioscler Thromb* 1991;11(1):116–22.
- Popescu M-C, Vasile C, Craciunescu O. Structural analysis of some soluble elastins by means of FT-IR and 2D IR correlation spectroscopy. *Biopolymers* 2010;93(12):1072–84.
- Prassl R, Schuster B, Abuja PM, Zechner M, Kostner GM, Laggner P. A comparison of structure and thermal behavior in human plasma lipoprotein(a) and low-density lipoprotein. Calorimetry and small-angle X-ray scattering. *Biochemistry* 1995;34(11):3795–801.
- Puett D, Ciferri A, Bianchi E, Hermans J. Helix formation of poly-L-lysine thiocyanate in aqueous solutions. *J Phys Chem* 1967;71(12):4126–8.
- Pungercar JR, Caglic D, Sajid M, Dolinar M, Vasiljeva O, Pozgan U, et al. Autocatalytic processing of procathepsin B is triggered by proenzyme activity. *FEBS J* 2009;276(3):660–8.
- Rijzewijk LJ, van der Meer RW, Smit JWA, Diamant M, Bax JJ, Hammer S, et al. Myocardial steatosis is an independent predictor of diastolic dysfunction in type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* 2008;52(22):1793–9.
- Samouillan V, Dandurand J, Lamure A, Maurel E, Lacabanne C, Gerosa G, et al. Thermal analysis characterization of aortic tissues for cardiac valve bioprostheses. *J Biomed Mater Res* 1999;46(4):531–8.
- Samouillan V, Dandurand J, Nasarre L, Badimon L, Lacabanne C, Llorente-Cortés V. Lipid loading of human vascular smooth muscle cells induces changes in tropoelastin protein levels and physical structure. *Biophys J* 2012;103(3):532–40.
- Sandberg LB. Elastin structure in health and disease. *Int Rev Connect Tissue Res* 1976;7:159–210.
- Sartipy P, Camejo G, Svensson L, Hurt-Camejo E. Phospholipase A(2) modification of low density lipoproteins forms small high density particles with increased affinity for proteoglycans and glycosaminoglycans. *J Biol Chem* 1999;274(36):25913–20.
- Sato S, Ashraf M, Millard RW, Fujiwara H, Schwartz A. Connective tissue changes in early ischemia of porcine myocardium: an ultrastructural study. *J Mol Cell Cardiol* 1983;15(4):261–75.
- Seo T, Al-Haideri M, Treskova E, Worgall TS, Kako Y, Goldberg IJ, et al. Lipoprotein lipase-mediated selective uptake from low density lipoprotein requires cell surface proteoglycans and is independent of scavenger receptor class B type 1. *J Biol Chem* 2000;275(39):30355–62.

- Servaty R, Schiller J, Binder H, Arnold K. Hydration of polymeric components of cartilage—an infrared spectroscopic study on hyaluronic acid and chondroitin sulfate. *Int J Biol Macromol* 2001;28(2):121–7.
- Sionkowska A, Skopinska-Wisniewska J, Gawron M, Kozłowska J, Planecka A. Chemical and thermal cross-linking of collagen and elastin hydrolysates. *Int J Biol Macromol* 2010;47(4):570–7.
- Staniszewska E, Malek K, Baranska M. Rapid approach to analyze biochemical variation in rat organs by ATR FTIR spectroscopy. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2014;118:981–6.
- Sun M, Chen M, Liu Y, Fukuoka M, Zhou K, Li G, et al. Cathepsin-L contributes to cardiac repair and remodelling post-infarction. *Cardiovasc Res* 2011;89(2):374–83.
- Swarnakar S, Beers J, Strickland DK, Azhar S, Williams DL. The apolipoprotein E-dependent low density lipoprotein cholesteryl ester selective uptake pathway in murine adrenocortical cells involves chondroitin sulfate proteoglycans and an alpha 2-macroglobulin receptor. *J Biol Chem* 2001;276(24):21121–8.
- Tamburro AM, Pepe A, Bochicchio B. Localizing alpha-helices in human tropoelastin: assembly of the elastin puzzle. *Biochemistry* 2006;45(31):9518–30.
- Van der Donck C, Van Herck JL, Schrijvers DM, Vanhoutte G, Verhoye M, Blockx I, et al. Elastin fragmentation in atherosclerotic mice leads to intraplaque neovascularization, plaque rupture, myocardial infarction, stroke, and sudden death. *Eur Heart J* 2014. <http://dx.doi.org/10.1093/eurheartj/ehu041> [in press].
- Vassiliou G, McPherson R. A novel efflux-recapture process underlies the mechanism of high-density lipoprotein cholesteryl ester-selective uptake mediated by the low-density lipoprotein receptor-related protein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24(9):1669–75.
- Yu VS, Kalnin NN. Quantitative IR spectrophotometry of peptide compounds in water (H₂O) solutions. I. Spectral parameters of amino acid residue absorption bands. *Biopolymers* 1990;30(13–14):1243–57.
- Vilalta M, Jørgensen C, Dégano IR, Chernajovsky Y, Gould D, Noël D, et al. Dual luciferase labelling for non-invasive bioluminescence imaging of mesenchymal stromal cell chondrogenic differentiation in demineralized bone matrix scaffolds. *Biomaterials* 2009;30(28):4986–95.

Supplementary data

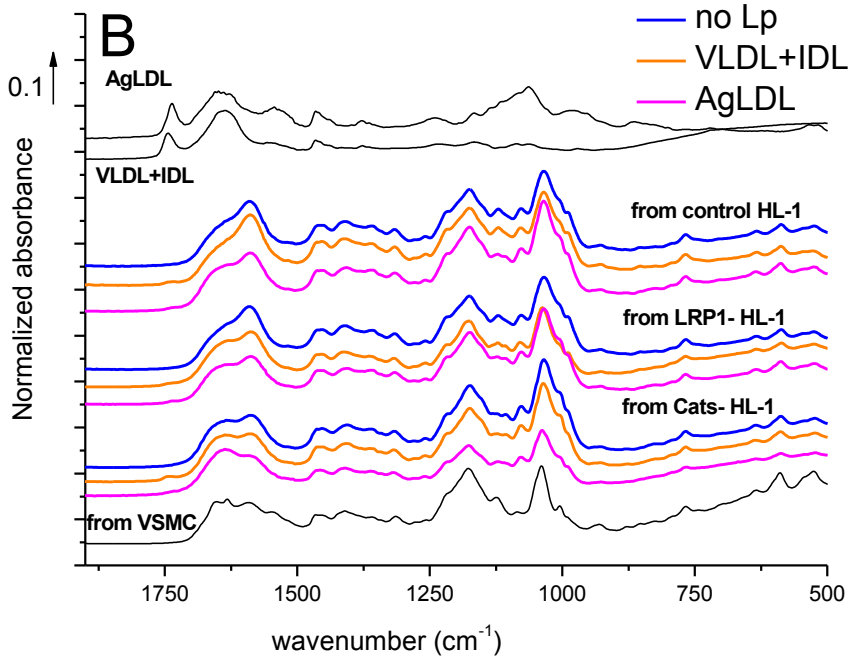
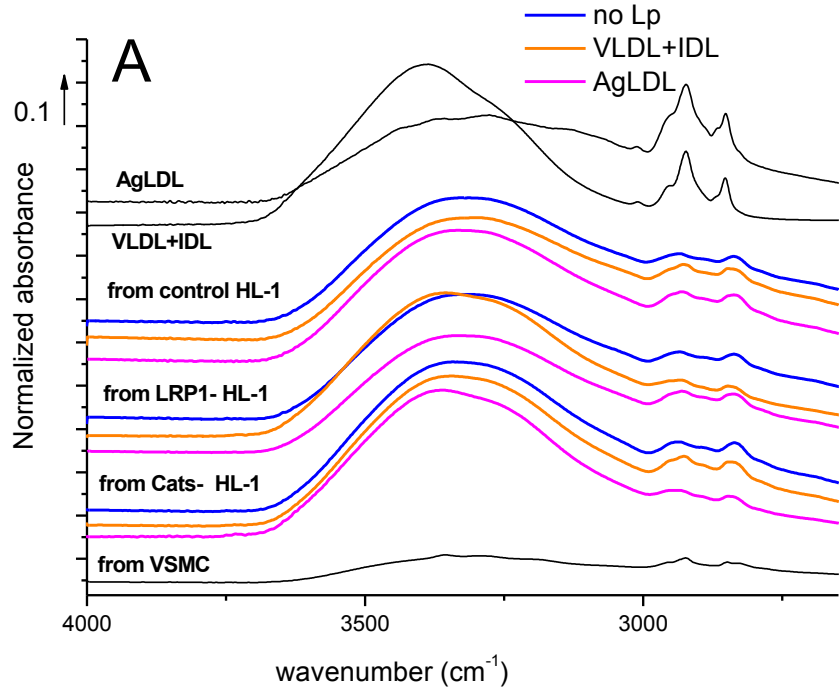
Table S1. FTIR bands assignment of supernatant fraction from control cardiomyocytes.

Band position (cm ⁻¹)	Assignment
3311 (large)	Amide A H-bonded $\nu(\text{O-H})$ and $\nu(\text{N-H})$
2955, 2933, 2850, 2833	$\nu(\text{C-H})$ aliphatic
1650, 1631	Amide I $\nu(\text{C=O})$
1591	$\nu_{\text{as}}(\text{COO-}), \nu(\text{C=C})$ (Tyr, Phe, His), $\delta(\text{NH}_2)$ (Gln)
1550	amide II $\nu(\text{CN}), \delta(\text{NH})$
1464-1452	$\delta(\text{CH}_2, \text{CH}_3)$ aliphatic side chains
1408	$\nu_{\text{s}}(\text{COO-})$ free amino-acids, glycoaminoglycans
1357, 1315	$\delta(\text{C-H})$
1224	amide III $\delta_{\text{plan}}(\text{N-H}), \nu_{\text{s}}(\text{SO}_4^{2-})$ proteoglycans
1202	$\delta(\text{COOH}), \text{Tyr, Phe}$
1176	$\gamma_{\text{w}}(\text{CH}_2), \text{Tyr}, \nu_{\text{as}}(\text{CO-O-C})$ phospholipids
1076	$\nu(\text{C-C}), \nu(\text{C-O-C}), \gamma_{\text{t}}(\text{CH}_2), \nu_{\text{s}}(\text{PO}_2^-)$ nucleic acids
1033, 1005	Phe, polysaccharides
930	$\nu(\text{C}\alpha\text{-C})$ characteristic of α -helices
530	$\nu(\text{S-S})$

Main absorption bands assigned to stretching and bending vibrations of chemical groups in accordance with literature data.

Table S2: Position and assignments of the decomposed amides I and II bands in heart tissues from control and diabetic rats.

control		diabetic	
Position (cm ⁻¹)	assignment	Position (cm ⁻¹)	assignment
1692	Anti parallel β sheets	1692	Anti parallel β sheets
1680	Anti parallel β turns	1680	Anti parallel β turns
1668	Turns, loops, undefined	1668	Turns, loops
1660	α like helices	1658	
1650	α helices/random	1650	α helices/random
1643	unordered	--	Not detectable
1631	β sheets	1629	
1547	β sheets	1545	β sheets
1537	unordered	--	Not detectable
1514	Anti// β sheets	1511	Anti // β sheets



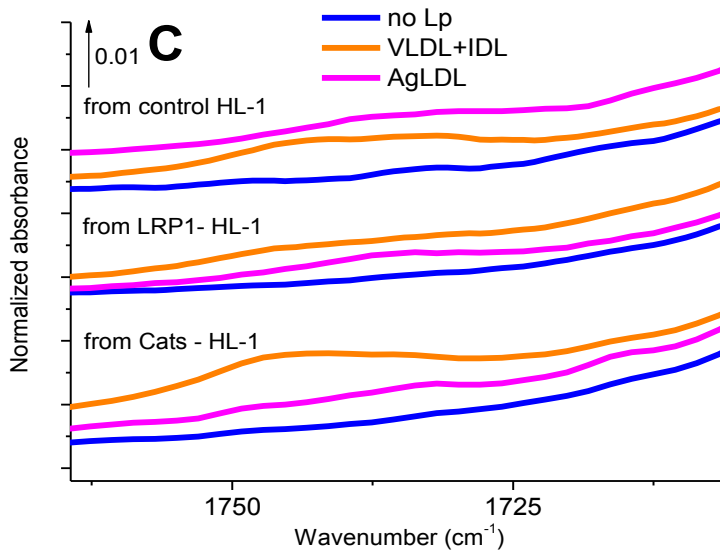


FIGURE S1. Normalized FTIR spectra in the 4000-2700 cm^{-1} zone (A) and in the 1800-500 cm^{-1} zone (B) and in the 1765-1705 cm^{-1} enlarged zone (C). Thin lines: VLDL+IDL, AgLDL and supernatant from VSMC; bold lines: supernatants from the different sets of HL-1 cardiomyocytes.

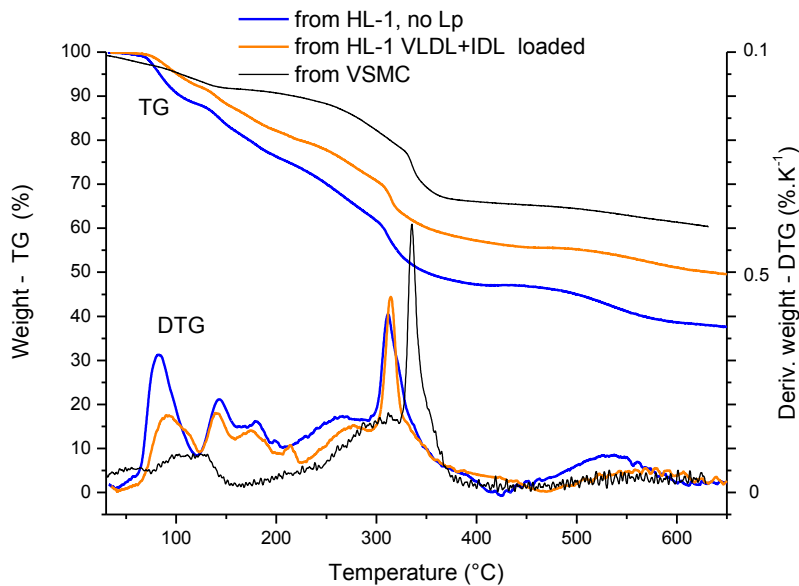


FIGURE S2. Thermogravimetric analysis of the purified supernatants from human VSMC (black line) and from control HL-1 cardiomyocytes. TG: thermogravimetric plots; DTG: first derivative plots.

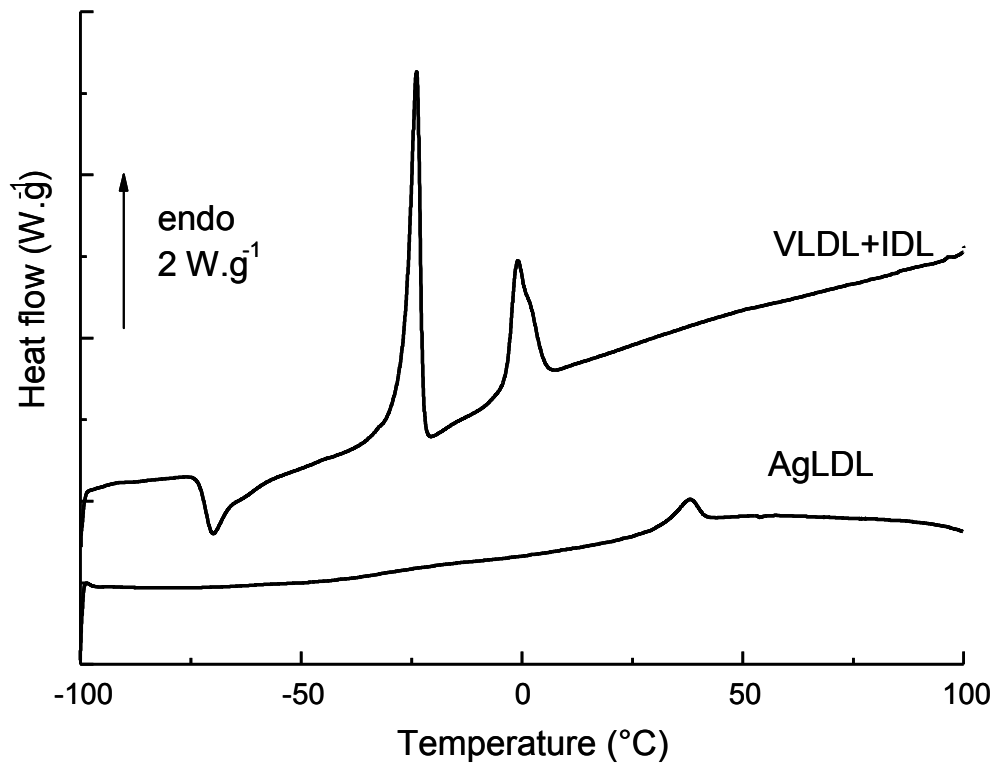


FIGURE S3. Differential Scanning Calorimetry thermograms of VLDL+IDL and AgLDL

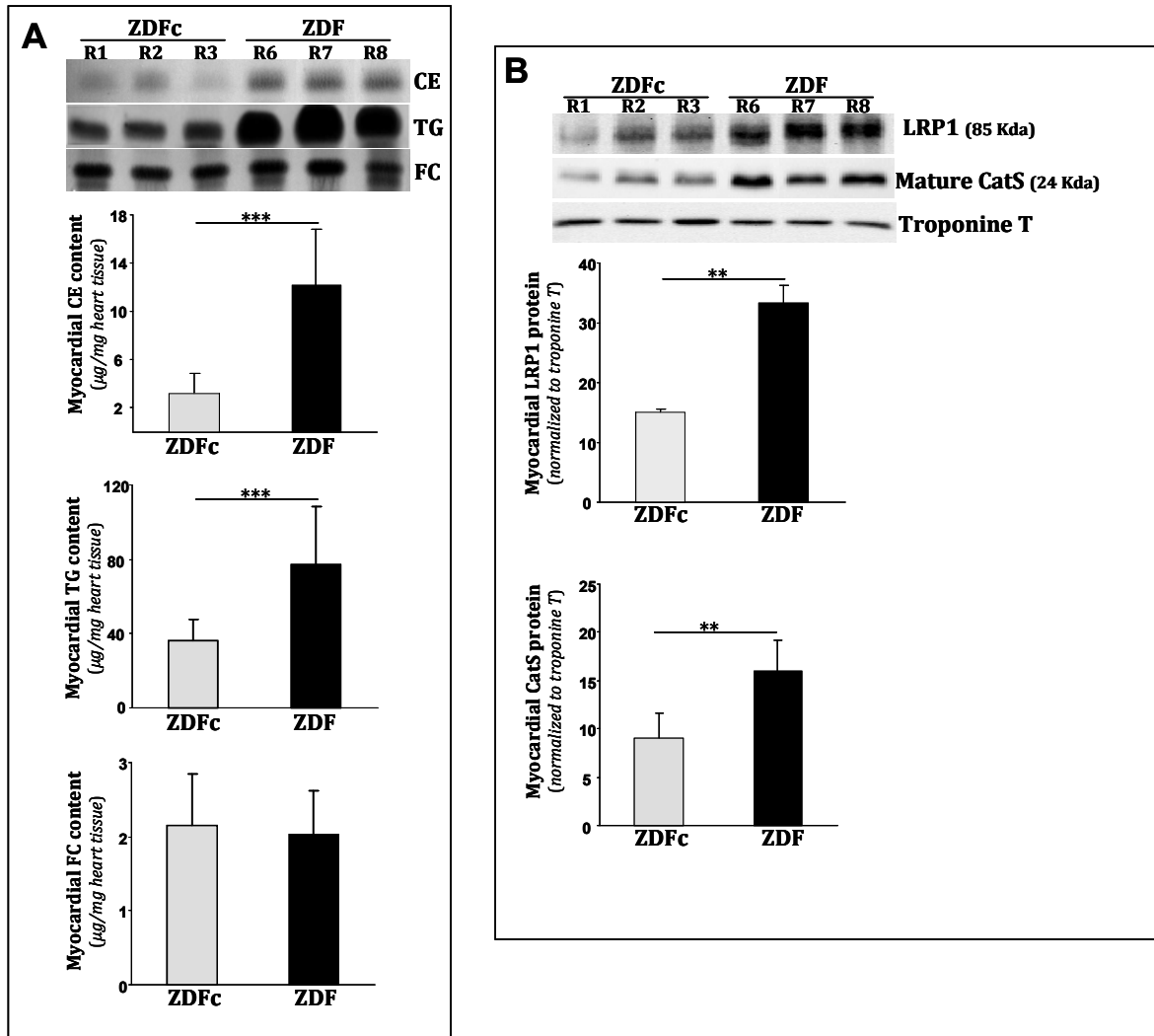


FIGURE S4. Neutral lipid accumulation in control (ZDFc) and diabetic (ZDF) rats. **A)** Thin layer chromatography showing cholesteryl ester (CE), triglyceride (TG) and free cholesterol (FC) bands and histograms with their quantification. Results are expressed as micrograms per milligram of protein and shown as mean±SEM of five animals. **B)** Representative Western blot analysis showing LRP1 and mature CatS protein levels in control and diabetic rats. Bar graphs showing the quantification of LRP1 and CatS normalized by troponin T bands. Results are expressed as arbitrary units and shown as mean±SEM of three experiments performed in triplicate. * $P < 0.05$ vs. cells unexposed to VLDL. # $P < 0.05$ vs. control cells. ** $P < 0.01$; *** $P < 0.01$.

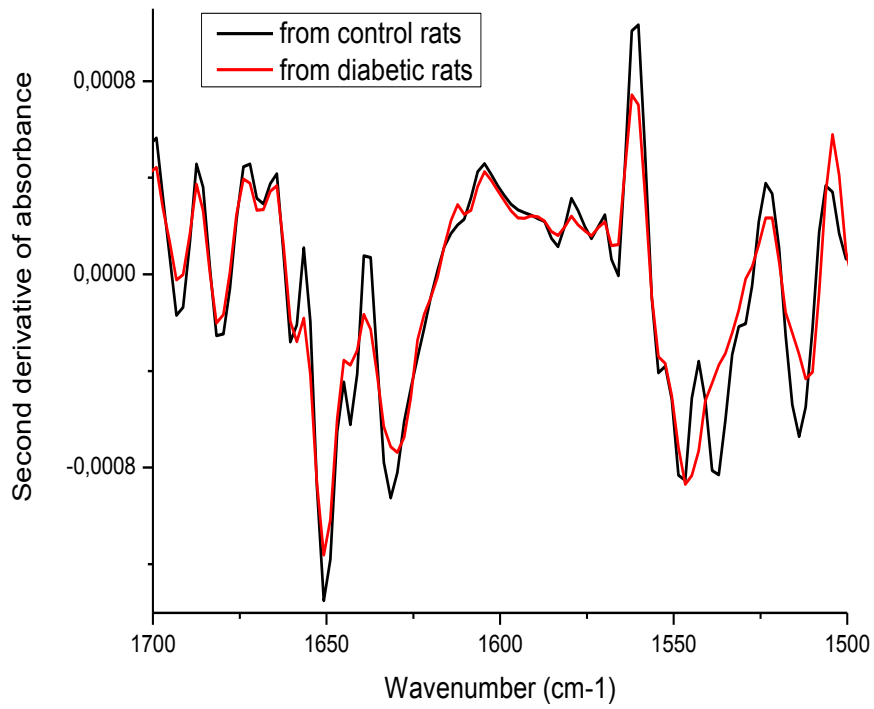


FIGURE S5. Second derivative FTIR spectra of fresh heart tissues from control and diabetic rats.

RESULTADOS: ARTÍCULO 3

Hypoxia-driven sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2 (SERCA2) downregulation depends on low-density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP1)-signaling in cardiomyocytes.

TITULO TRADUCIDO: La regulación a la baja del *sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2* (SERCA2) en hipoxia depende de la señalización del receptor *low-density lipoprotein receptor-related protein-1* (LRP1) en cardiomiocitos.

REVISTA: Journal of Molecular and Cellular Cardiology

AUTORES: **Elena Revuelta-López**¹, Roi Cal¹, Adela Herraiz¹, David de Gonzalo-Calvo¹, Laura Nasarre¹, Santiago Roura², Carolina Galvez-Monton², Antoni Bayes-Genis², Lina Badimon¹, Leif Hove-Madsen¹, Vicenta Llorente-Cortés¹.

¹Centro de Investigación Cardiovascular CSIC-ICCC, IIB-Sant Pau, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, España.

²ICREC, Programa de Investigación, Fundació Institut d'Investigación en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol (IGPT), Badalona, España.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Molecular and Cellular Cardiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yjmcc

Original article

Hypoxia-driven sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2 (SERCA2) downregulation depends on low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1)-signalling in cardiomyocytes



Elena Revuelta-López^a, Roi Cal^a, Adela Herraiz-Martínez^a, David de Gonzalo-Calvo^a, Laura Nasarre^a, Santiago Roura^b, Carolina Gálvez-Montón^b, Antoni Bayes-Genis^b, Lina Badimon^a, Leif Hove-Madsen^a, Vicenta Llorente-Cortés^{a,*}

^a Cardiovascular Research Center, CSIC–ICCC, IIB-Sant Pau, Barcelona, Spain

^b ICREC Research Program, Health Science Research Institute Germans Trias i Pujol, Can Ruti Campus, Badalona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 April 2015

Received in revised form 29 April 2015

Accepted 30 April 2015

Available online 9 May 2015

Keywords:

LRP1

Pyk2

SERCA2

Hypoxia

Cardiomyocytes

ABSTRACT

The maintenance of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase (SERCA2) activity is crucial for cardiac function and SERCA2 is dramatically reduced in the heart exposed to hypoxic/ischemic conditions. Previous work from our group showed that hypoxia upregulates the phosphorylated form of the Ca²⁺-dependent nonreceptor protein tyrosine kinase (PTK) proline-rich tyrosine kinase 2 (pPyk2) protein levels in a low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP1)-dependent manner. Pyk2 in turn may modulate SERCA2 in cardiomyocytes although this remains controversial. We therefore aimed to investigate the role of LRP1 on hypoxia-induced SERCA2 depletion in cardiomyocytes and to establish LRP1 signalling mechanisms involved. Western blot analysis showed that hypoxia reduced SERCA2 concomitantly with a sustained increase in LRP1 and pPyk2 protein levels in HL-1 cardiomyocytes. By impairing hypoxia-induced Pyk2 phosphorylation and HIF-1 α accumulation, LRP1 deficiency prevented SERCA2 depletion and reduction of the sarcoplasmic reticulum calcium content in cardiomyocytes. Moreover, the inhibition of Pyk2 phosphorylation (with the Src-family inhibitor PP2) or the specific silencing of Pyk2 (with siRNA-anti Pyk2) preserved low HIF-1 α and high SERCA2 levels in HL-1 cardiomyocytes exposed to hypoxia. We determined that the LRP1/Pyk2 axis represses SERCA2 mRNA expression via HIF-1 α since HIF-1 α overexpression abolished the protective effect of LRP1 deficiency on SERCA2 depletion. Our findings show a crucial role of LRP1/Pyk2/HIF-1 α in hypoxia-induced cardiomyocyte SERCA2 downregulation, a pathophysiological process closely associated with heart failure.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Several studies have reported that a reduction in sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase (SERCA2) activity is deleterious for cardiac function in animal models and humans [1–3]. SERCA2 suppression is also a hallmark feature of ischemic heart disease [4,5]. Indeed, gene transfer of SERCA2 to cardiomyocytes has been shown to restore contractile dysfunction in failing human cardiomyocytes and in heart failure animal models [6–9]. Interestingly, it has been shown in preclinical studies that SERCA2 overexpression during ischemia/reperfusion reduces arrhythmias [10], one of the most serious life-threatening complications of ischemic heart disease. Therefore, it is crucial to explore the molecular mechanisms involved in SERCA2 suppression under hypoxia/ischemia. It has been proposed that SERCA2 expression is modulated by the

Ca²⁺-dependent nonreceptor protein tyrosine kinase (PTK) proline-rich tyrosine kinase 2 (Pyk2) [11,12], which is expressed in both cardiomyocytes [13] and human hearts [12]. Nevertheless, there are controversial results concerning the effect of Pyk2 phosphorylation on SERCA2 expression. Heidkamp MC et al. [11] proposed that Pyk2 negatively modulates SERCA2 mRNA expression in neonatal rat cardiomyocytes. In contrast, Lang D et al. [12] reported that SERCA2 mRNA levels are lower in myocardium from Pyk2-deficient animals.

We previously showed that low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) expression is essential for hypoxia-induced pPyk2 in human vascular smooth muscle cells [14]. LRP1 participates in signal transduction through phosphorylation of its β chain [15–17]. Once activated, LRP1 modulates the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (ERK) cascade [18–20] and signal transduction pathways initiated by platelet-derived growth factor receptors (PDGF-R) [21,22]. Binding of LRP1 to ligands such as α_2 M/apoE in neurons [23] or defensins in medial smooth muscle cells in human coronary arteries [24] regulates intracellular calcium-signalling. Notably, hypoxia,

* Corresponding author at: Cardiovascular Research Center, CSIC–ICCC, IIB-Sant Pau, Spain. Tel.: +34 935565888, fax: +34 935565559.
E-mail address: cllorente@csic-iccc.org (V. Llorente-Cortés).

which increases LRP1 expression in human vascular cells [14,25] and HL-1 cardiomyocytes [26], also increases intracellular calcium levels and alters phosphorylation of Pyk2 [14,27].

The aims of this work were to investigate the role of LRP1 on hypoxia-induced SERCA2 depletion in a stable cell line of LRP1-deficient HL-1 cardiomyocytes and to establish the LRP1-related signalling mechanisms involved.

2. Material and methods

2.1. HL-1 cardiomyocyte cell culture

The murine HL-1 cell line was generated by Dr. W.C. Claycomb (Louisiana State University Medical Centre, New Orleans, Louisiana, USA) and kindly provided by Dr. U Rauch (Charité-Universitätsmedizin Berlin). These cells show cardiac characteristics similar to those of adult cardiomyocytes [28,29]. HL-1 cells were maintained in Claycomb Medium (JRH Biosciences, Lenexa, KS, USA) supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS) (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA), 100 µM norepinephrine, 100 units/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, and L-glutamine 2 mM (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) in plastic dishes, coated with 12.5 µg/mL fibronectin and 0.02% gelatin, in a 5% CO₂ atmosphere at 37 °C.

2.2. Small interference RNA-mediated gene silencing of LRP1, VLDLR, LDLR and Pyk2

To inhibit LRP1, VLDLR and LDLR, HL-1 cells were transiently transfected with either LRP1, VLDLR, LDLR or Pyk2 specific siRNAs acquired from Applied Biosystems (siRNA ID: 69313, s75976, s69154, s72404, respectively). A siRNA-random was used as a negative control (Ambion AM 4636) in cellular transfections. HL-1 cells were transfected with siRNA by the nucleofection technique using the Cell line Nucleofector™ kit L (VCA-1005) from LONZA-Amaya according to the manufacturer's instructions. The final siRNA transfection concentration for siRNAs was 0.6 µmol/L. After 48 h of nucleofection, cells were exposed to normoxia or hypoxia for different times and harvested by scraping in TriPure Reagent (Roche) for PCR and Western blot analysis.

2.3. Generation of LRP1-deficient cardiomyocytes

2.3.1. Design of LRP1 miRNA lentiviral vectors

A sequence miR RNAi (XM_8531) was designed to downregulate LRP1 (accession number. XM_001056970) and cloned into pLenti6.4-CMV-MSGW (Invitrogen). A universal insert negative control (Invitrogen, pcDNA™ 6.2-GW/miR negative control) was also used as previously described [26].

2.3.2. Lentiviral particle production

Lentiviral particle production was performed as previously described with some modifications. Briefly, the day prior transfection, 3 × 10⁶ human embryonic kidney 293T cells were seeded on 10 cm² plates. Lentiviral transfer vector (pLenti6.4-CMV-MSGW/miR, 6 µg), viral envelope plasmid (pMD-G-VSV-G, 2 µg) and packaging construct (pCMV-ΔR8.2, 4 µg) were mixed with 150 mM sodium chloride, added to 250 µL of PEI-NaCl solution (Polyplus transfection) and incubated at room temperature (RT) for 20 min. This DNA solution was then added drop-wise to the plate containing the 293T cells with medium, swirled gently, and incubated for 16 h at 37 °C with 5% CO₂. The following day, the transfection solution was removed, and medium without foetal bovine serum (FBS) was added to the cells and it was maintained for 48 h. The supernatant was then collected, centrifuged, and filtered through a 0.45 µm low protein-binding filter (Corning, Bath, United Kingdom). The filtered supernatant was concentrated using Amicon Ultra Centrifugal Filters (Millipore) following manufacturer's instructions.

2.3.3. LRP1-deficient cardiomyocyte generation

Lentivirus stocks and a negative control generated from the resulting constructs were tittered by blasticidin selection. In order to generate a stock of LRP1-deficient HL-1 cells (LRP1⁻), they were stably transduced with 10 MOI lentivirus and maintained in a complete medium supplemented with blasticidin (10 µg/mL) to select blasticidin-resistant colonies. HL-1 cell clones with maximal LRP1 downregulation were selected, grown with blasticidin and used in further experiments.

2.4. Exposure of HL-1 cells to normoxic and hypoxic conditions

Cells were exposed to normoxia (21% O₂) in a Nirco gas incubator with gas mixtures consisting of 74% N₂ and 5% CO₂ or to hypoxia (1% O₂) in a Hypoxic/Anoxic Workstation: H35 (Don Whitley Scientific Ltd.) with 94% N₂ and 5% CO₂. Cells were then harvested in TriPure Reagent for PCR and Western blot analysis. In some experiments, cells were exposed to PP2 (50 µM) (#529573, Calbiochem), U0126 (10 µM) (#99035, Cell Signalling Technology), Wortmannin (WT, 100 nM) (W1628, Sigma-Aldrich) or K252a (15 µM) (#420298, Calbiochem) for 4 h.

2.5. Transient transfection assays

Transient transfection of control and LRP1-deficient HL-1 cardiomyocytes was performed with Lipofectamine® Reagent (Invitrogen) using hypoxia inducible factor-1α (HIF-1α) expression vector (pHIF-1α 10 ng), kindly provided by Dr. Luis del Peso (Department of Biochemistry, Autonoma University, Madrid, Spain), or the corresponding empty vector (pcDNA3). Cells were collected on buffer lysis to test HIF-1α and SERCA2 protein levels by Western blot analysis.

2.6. Immunocytochemistry

Control and LRP1-deficient HL-1 cardiomyocytes were seeded onto glass coverslips, arrested for 24 h with FCS 0.2%, exposed to hypoxia for 8 h, and then fixed with 4% paraformaldehyde. To analyse pPyk2 and SERCA2 staining, fixed cells were permeated and incubated with primary antibodies against pPyk2 (Santa Cruz, sc-16824, dilution 1:50) and SERCA2 (Sigma Aldrich S.A., S1314, dilution 1:50). Coverslips were then washed and incubated appropriated secondary antibodies. Images of immunostained cells were analysed on a Leica inverted fluorescence confocal microscope (Leica TCS SP2-AOBS, Wetzlar, Germany) and processed with the Leica Standard Software TCS-AOBS.

2.7. Real time PCR

The PCR-7000 Sequence Detection System of ABI PRISM (Applied Biosystems) was used to perform real time PCR with the assays on demand, detailed in Table 1 *online*, to test the expression of lipoprotein receptors and calcium-handling genes. *Rplp0* (Rn00821065_g1) was used as endogenous control. Taqman real-time PCR was performed with 1 µL/well of RT products (1 µg total RNA) in 10 µL of TaqMan PCR Master Mix (PE Biosystem) with the primers at 300 nM and the probe at 200 nM. PCR was performed at 95 °C for 10 min (for AmpliTaq Gold activation) and then run for 40 cycles at 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. The threshold cycle (Ct) values were determined and normalized to endogenous control.

2.8. Isolation of nuclear and cytosolic extracts from HL-1 cardiomyocytes

Nuclear and cytosolic extracts were obtained from control and LRP1-deficient HL-1 cardiomyocytes exposed to normoxia or hypoxia using the Protein and RNA Isolation System™ Kit (Ambion Inc., Austin, TX) according to the manufacturer's recommendations. Cytosolic and nuclear extracts were aliquoted and stored at -80 °C until use.

2.9. Western blot

Blots were incubated with monoclonal antibodies (Abs) against LRP1 (Epitomics 2703-1, dilution 1:7000), phosphorylated Akt (#4685, Cell Signalling, dilution 1:2000), total Akt (#4685, Cell Signalling, dilution 1:1000), phosphorylated Pyk2 (Cell Signalling Technology #3291, dilution 1:1000), total Pyk2 (Cell Signalling Technology #3480, dilution 1:1000), phosphorylated ERK1,2 (Cell Signalling Technology #9101, dilution 1:1000), total ERK1,2 (Stressmarq Biosciences Inc. SPC-120 C/D, dilution 1:5000), HIF-1 α (Santa Cruz sc-10790, dilution 1:50), I κ B α (Cell Signalling Technology #4814, dilution 1:1000), phospho NF κ B p65 (Cell Signalling Technology #3039, dilution 1:1000), total NF κ B p65 (Cell Signalling Technology #4764, dilution 1:1000), nucleolin (Abcam Ab22758, dilution 1:1000) SERCA2 (Cell Signalling Technology #9580, dilution 1:1000), Na⁺/Ca²⁺ exchanger 1 (NCX-1) (alomone labs ANX-011, dilution 1:200), voltage-dependent L-type α 1C-subunit (CAV1.2) (alomone labs ACC-003, dilution 1:200), phosphorylated phospholamban (pPLN) (Cell Signalling Technology #8496, dilution 1:1000) and total phospholamban (PLN) (Cell Signalling Technology #8495, dilution 1:1000). Equal protein loading in each lane was verified by staining filters with Ponceau and also by incubating blots with monoclonal antibodies against β -tubulin (Abcam, ab6046, dilution 1:1000).

2.10. Intracellular calcium handling

To detect changes in intracellular calcium handling, HL-1 cardiomyocytes were loaded with CAL-520 AM (#21130 AAT Bioquest) and calcium was assessed in a 0.5 \times 0.5 mm² of the cell culture using a resonance scanning confocal microscope (Leica SP5 AOBs) with a 20 \times objective as previously described [30]. Briefly, cell cultures were loaded with 2 μ M of the calcium indicator CAL-520 AM for 20 min at RT followed by 30 min of deesterification. CAL-520 was excited at 488 nm with the laser intensity set to 20% and subsequent attenuation to 15%. Fluorescence emission was collected between 505 and 650 nm, and changes in intracellular calcium were estimated by normalizing the fluorescence emission (F) to the fluorescence emission at rest (F₀). The experimental solution contained (in mM): NaCl 132, KCl 4, NaH₂PO₄ 0.33, NaHCO₃ 4, CaCl₂ 2, MgCl₂ 1.6, HEPES 10, glucose 5, and pyruvic acid 5 (pH = 7.4). This solution was perfused at 35 $^{\circ}$ C, with a flow rate of 49.38 mm/s. To load the sarcoplasmic reticulum (SR), HL-1 cardiomyocytes were subjected to electrical field stimulation using square pulses of 5 ms duration and with the voltage set at 1.5 \times the stimulation threshold. The SR calcium content was estimated from the amplitude of the calcium transient elicited by rapid exposure of the myocytes to 10 mM caffeine for 20 s with a rate flow of 145.4 mm/seg, which releases calcium from the SR.

2.11. Collection of human samples

A total of 6 explanted human hearts from ischemic cardiomyopathy patients were collected and immediately processed. In particular, these patients were undergoing cardiac transplantation at Sant Pau Hospital, Barcelona. Clinical data, electrocardiogram, Doppler echocardiography, hemodynamic studies, and coronary angiography were available. All patients were functionally classified according to the New York Heart Association (NYHA) criteria, and were receiving medical treatment according to the guidelines of the European Society of Cardiology [31], with diuretics 90%, angiotensin-converting enzyme inhibitors 87%, β -blockers 50%, aldosterone antagonists 70%, digoxin 49% and statins 80%. Four non-diseased hearts were also obtained from donors with neurological death caused by traffic accident. The hearts were initially considered for cardiac transplantation but were subsequently deemed unsuitable for transplantation either because of blood type or size incompatibility. All donors had normal LV function and no history of myocardial disease or active infection. Transmural samples were taken from the infarct border zone, and were immediately stored at -80° C. The project was approved by the local Ethics Committee (Sant Pau,

Barcelona, Spain) and conducted in accordance with the guidelines of the Declaration of Helsinki. All patients gave written informed consent that was obtained according to our institutional guidelines. Frozen ventricular tissues (25 mg) were pulverized using a mortar and a pestle in liquid nitrogen. Sample were then homogenized in TriPure isolation reagent (Roche Molecular Biochemicals) for total RNA and protein extraction according to the manufacturer's instructions.

2.12. Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm SEM and the number of experiments is shown in every case. Non-parametrical Kruskal–Wallis H test was used to compare variables between study groups. When a significant P-value was achieved, non-parametric Mann–Whitney U T test was used to analyse specific differences between the study groups.

3. Results

3.1. Hypoxia upregulates LRP1 and pPyk2 and downregulates SERCA2 protein levels

Western blot analysis showed that hypoxia induced a sustained increase in LRP1 expression (Figs. 1A & B) and pPyk2/Total Pyk2 ratio (Figs. 1A & C) from 3 to 24 h in HL-1 cardiomyocytes. Concomitantly, an early downregulatory effect of hypoxia on SERCA2 protein expression was observed in these cells (Figs. 1A & D). Online Fig. S1 showed that hypoxia transiently upregulated pERK1,2/total ERK1,2 ratio at 4 h. However, at 16 h, pERK1,2/total ERK1,2 ratio was significantly decreased in hypoxic HL-1 cells.

3.2. LRP1 inhibition but not VLDLR or LDLR inhibition prevents Pyk2 phosphorylation and SERCA2 depletion caused by hypoxia

To know whether LRP1, VLDLR or LDLR are involved in Pyk2 activation by hypoxia, HL-1 cells were treated with specific siRNA against these receptors. Specific siRNA-LRP1, siRNA-VLDLR and siRNA-LDLR specifically inhibited LRP1 (Figs. 2A & B), VLDLR (Figs. 2A & C) and LDLR protein (Figs. 2A & D) levels, respectively, either in normoxic or hypoxic HL-1 cells. Similar results were obtained at mRNA expression level by real-time PCR (online Fig. S2). As shown in Figs. 2A & E, hypoxia-induced Pyk2 phosphorylation was specifically prevented in siRNA-LRP1 treated HL-1 cells. Our results also showed that SERCA2 protein levels were strongly downregulated in HL-1 cells transfected with siRNA-random, siRNA-VLDLR and siRNA-LDLR, but not in those transfected with siRNA-LRP1 (Figs. 2A & F). In agreement with Western blot analysis, real time PCR results showed that LRP1 inhibition but not the inhibition of other receptors from the same family prevented hypoxia-induced SERCA2 mRNA downregulation in HL-1 cardiomyocytes (online Fig. S3A). In contrast, siRNA-LRP1 treatment did not significantly alter the effect of hypoxia on RyR2 (online Fig. S3B) IP3R1 (online Fig. S3C) and IP3R1 (online Fig. S3D) mRNA expression. Taken together, these results indicate that LRP1 but not other receptors of the same family modulates SERCA2 mRNA. Therefore, we generated a stable cell line of LRP1-deficient HL-1 cardiomyocytes to facilitate the study of LRP1 signalling associated with SERCA2 depletion in hypoxic cardiomyocytes.

3.3. LRP1-dependent signalling is specifically involved in hypoxia-induced SERCA2 reduction and hypoxia-induced calcium-handling alterations

First, we compared the response to hypoxia of HL-1 cardiomyocytes stably transfected with pLenti6.4 containing the miR (LRP1⁻ cells) and those transfected with the negative control (LRP1⁺ cells). Confocal microscopy images (Fig. 3) showed that pPyk2 staining (in red) was strongly increased by hypoxia in LRP1⁺ but not in LRP1⁻ cells. In contrast, SERCA2 staining (in green) was strongly downregulated by

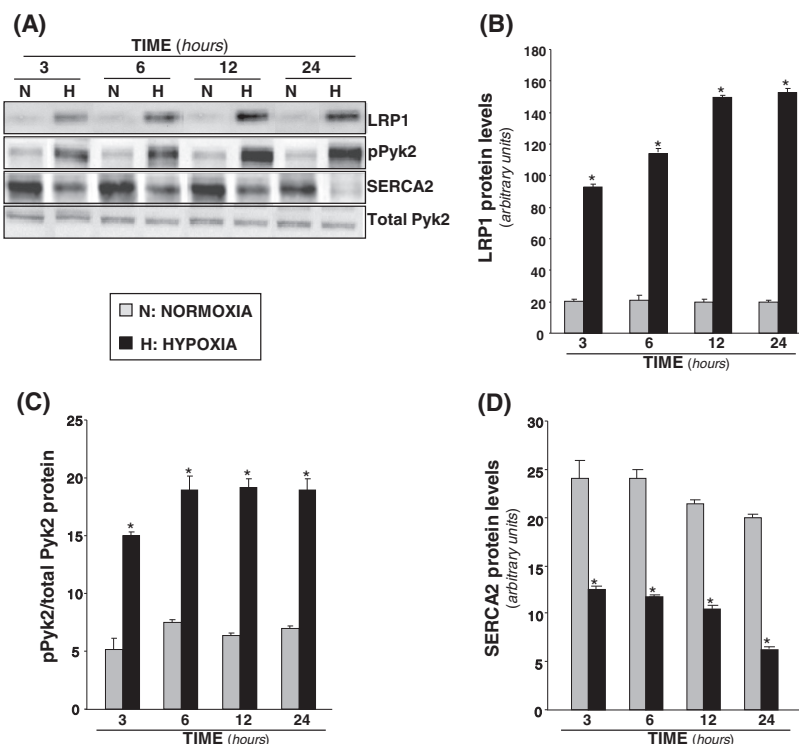


Fig. 1. Time-course of hypoxia-induced LRP1 and Pyk2 phosphorylation and SERCA2 downregulation in HL-1 cardiomyocytes. Cells were exposed to either normoxia or hypoxia for 3, 6, 12 and 24 h. Representative Western blot analysis showing LRP1, pPyk2, total Pyk2, and SERCA2 protein bands (A) Bar graphs show quantification of LRP1 (B), pPyk2/total Pyk2 ratio (C) and SERCA2 (D) in normoxic (grey bars) and hypoxic (black bars) conditions. Results are expressed as mean \pm SEM of two independent experiments performed in triplicate. N, normoxia; H, hypoxia. * $P < 0.05$ vs. normoxic cells.

hypoxia in LRP1 + but not in LRP1 - cells. We next explored the role of LRP1 in hypoxia-activated signalling. Western blot analysis showed that, in LRP1 - compared to LRP1 + cardiomyocytes (Figs. 4A & B), hypoxia failed to induce Akt (Figs. 4A & C) and Pyk2 phosphorylation (Figs. 4A & D). Like in siRNA-LRP1 treated HL-1, SERCA2 was not down-regulated by hypoxia in LRP1 - cardiomyocytes (Figs. 4E & F). We then tested whether LRP1 abatement influences the effect of hypoxia on other excitation-contraction coupling (ECC) proteins controlling calcium release. We found that hypoxia significantly decreased NCX-1 (online Fig. S4A & Fig. S4B) and CAV1.2 (online Fig. S4A & Fig. S4C) proteins in an LRP1-independent manner. The pentameric form of PLN, differently to SERCA2, NCX and CAV1.2 was unaltered by hypoxia or LRP1 deficiency (Figs. 4E & G). These results indicate that LRP1 signalling is specifically involved on the hypoxic modulation of SERCA2 and not of other ECC proteins. To test whether SERCA2 preservation is functionally translated into maintenance of normal calcium-handling metabolism, we analysed hypoxia-induced changes in the SR calcium content in LRP1 + and LRP1 - cardiomyocytes. For that, LRP1 + and LRP1 - cardiomyocytes were exposed to hypoxia and subsequently loaded with CAL-520 AM for calcium imaging. To measure the SR calcium content, myocytes were exposed to 10 mM caffeine, which releases calcium from the SR. Fig. 5A shows the calcium images of a representative HL-1 culture before (a) and during exposure to 10 mM caffeine (b-f). The resulting calcium transient is shown in Fig. 5B. Hypoxia significantly decreased the mean amplitude (F/F₀) of the caffeine induced calcium transient (Fig. 5C).

However, hypoxia did not significantly reduce calcium transient amplitude in LRP1-deficient cardiomyocytes. These results indicate that the restoration of SERCA2 expression through LRP1 deficiency is sufficient to prevent hypoxia-induced alterations on calcium transient amplitude.

3.4. LRP1-dependent signalling is essential for hypoxic-induced HIF-1 α accumulation and HIF-1 α overexpression counteracts SERCA2 preservation in hypoxic LRP1-deficient HL-1 cardiomyocytes

Cellular subfractionation experiments showed that hypoxia significantly activated NF κ B signalling in HL-1 cardiomyocytes promoting a decrease in the cytosolic levels of I κ B α that parallels the translocation of P-p65 from the cytosol to the nucleus (Fig. 6A). This effect was completely prevented in LRP1 - cells. These experiments also showed that hypoxia failed to induce HIF-1 α overaccumulation in LRP1 - cells (Fig. 6A). These results point out that the impairment of HIF-1 α overaccumulation may be involved in the downregulatory effect of hypoxia on SERCA2 expression. To investigate whether increased amounts of HIF-1 α overcome SERCA2 preservation in LRP1 - cells, we performed transient transfection assays of hypoxic HL-1 cardiomyocytes using a vector overexpressing HIF-1 α (pHIF-1 α). As shown in Fig. 6B, HIF-1 α was detected in LRP1 + but not in LRP1 - exposed to hypoxia for 8 h. In this situation, SERCA2 was preserved in LRP1 -, both transfected with pcDNA vector. However, in pHIF-1 α transfected cells, HIF-1 α was strongly raised, and SERCA2 was similarly depleted in

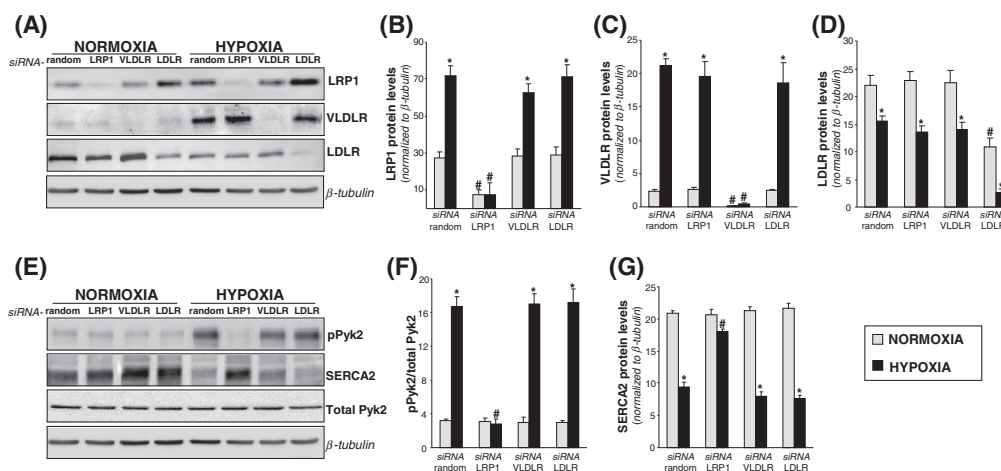


Fig. 2. Effect of specific abrogation of lipoprotein receptors (LRP1, VLDL and LDLR) on Pyk2 phosphorylation and SERCA2 protein levels in HL-1 cardiomyocytes. Quiescent HL-1 cells were specifically transfected with siRNA-random, siRNA-LRP1, siRNA-VLDLR and siRNA-LDLR (0.6 μ mol/L) by nucleofection. Cells were then exposed to normoxia or hypoxia and harvested at 16 h to assess LRP1, VLDLR, LDLR, pPyk2, total Pyk2 and SERCA2 protein levels. Representative Western blot analysis (A) and bar graphs showing LRP1 (B), VLDLR (C), and LDLR (D) protein levels; representative Western blot analysis (E) and bar graphs showing pPyk2/total Pyk2 (F) and SERCA2 protein levels (G). β -Tubulin was detected as loading control. Results are expressed as mean \pm SEM of two independent experiments performed in triplicate. * $P < 0.05$ vs. normoxic cells, # $P < 0.05$ vs. siRNA-random treated cells.

LRP1 – and LRP1 +. These results indicate that impairment of HIF-1 α accumulation is crucial for SERCA2 preservation in LRP1 – cardiomyocytes.

3.5. The activation of Pyk2/HIF-1 α axis by hypoxia plays a crucial role in SERCA2 depletion

The impairment of hypoxia-induced Akt phosphorylation in LRP1 – cells suggest that PI3K may participate on the hypoxic modulation of SERCA2. To investigate potential second messengers involved in this process, we used several specific intracellular signalling suppressors such as U0126 (an ERK1,2 inhibitor), Wortmannin (WT, a PI3K inhibitor)

and K252a (a tyrosin protein kinase inhibitor). As shown in Fig. 7A, both Wortmannin and K252a prevented Akt phosphorylation (Figs. 7A & B) but not ERK1,2 phosphorylation (Figs. 7A & C) induced by hypoxia. Similar to Akt phosphorylation, hypoxia-induced Pyk2 phosphorylation was prevented by Wortmannin and K252a but not by U0126 (Figs. 7A & D). U0126, that completely prevented hypoxia-induced ERK1,2 phosphorylation (Figs. 7A & C), did not exert any significant effect on Akt (Figs. 7A & B) or Pyk2 (Figs. 7A & D) phosphorylation in hypoxic cells, indicating that PI3K but not ERK1,2 mediators are essential for hypoxia-induced Pyk2 phosphorylation. SERCA2 protein levels (Figs. 7A & E) were significantly decreased by hypoxia in U0126-treated but not in

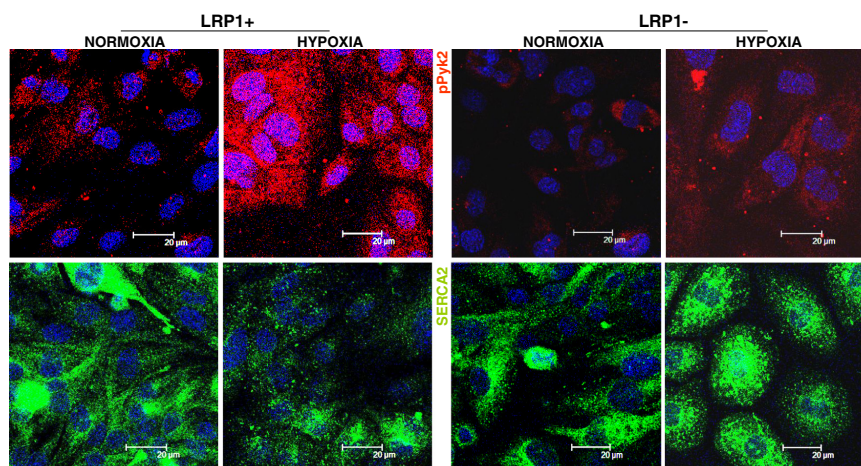


Fig. 3. Confocal microscopy images showing pPyk2 and SERCA2 distribution in control and LRP1-deficient HL-1 cardiomyocytes. Stable cell lines corresponding to control and LRP1-deficient HL-1 cardiomyocytes were exposed to normoxic or hypoxic conditions for 8 h. Representative confocal microscopy images of pPyk2 staining (in red) and SERCA2 (in green) are shown. Scale bar = 20 μ m. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

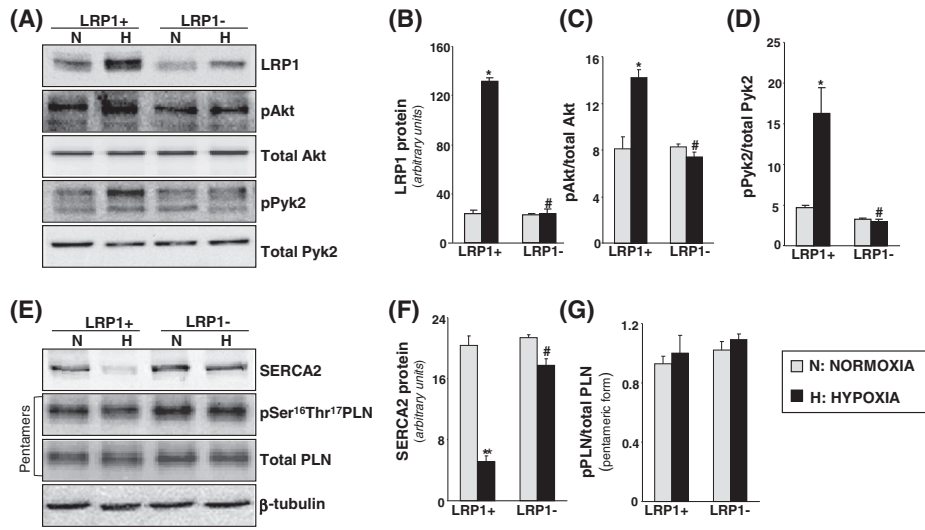


Fig. 4. Impact of LRP1 deficiency in the effect of hypoxia on LRP1-signal mediators, ECC proteins and calcium transient amplitude. Stable cell lines corresponding to control (LRP1+) and LRP1-deficient (LRP1-) HL-1 cardiomyocytes were exposed to normoxic or hypoxic conditions for 4 h (signal mediators) or 16 h (calcium-handling proteins). Representative Western blot analysis showing protein levels of LRP1-signal mediators (A) (pAkt, total Akt, pPyk2, and total Pyk2) and of ECC (E) (SERCA2, pSer¹⁶Thr¹⁷PLN and total PLN) bands. Bar graphs represent quantification of LRP1 (B), pAkt/total Akt (C), pPyk2/total Pyk2 (D), SERCA-2 (F), and the pentameric pPLN/total PLN protein levels (G). β -Tubulin was detected as loading control. Data from four independent experiments performed in triplicate are expressed as mean \pm SEM. N, normoxia; H, hypoxia. * $P < 0.05$ vs. normoxic cells, # $P < 0.05$ vs. LRP1+ cells.

Wortmannin and K125a-treated HL-1 cardiomyocytes, suggesting that Pyk2 phosphorylation is a crucial step in SERCA2 downregulation by hypoxia. To explore the role of Pyk2 on SERCA2 depletion we used pharmacological and siRNA approaches. As a first approach to determine whether Pyk2 activation is sufficient to reduce SERCA2 mRNA and protein levels, we tested the effect of PP2 (Src-family PTK inhibitor) on HIF-1 α

and SERCA2 protein levels. PP2, which efficiently impaired hypoxia-induced Pyk2 phosphorylation (Figs. 8A & B), efficiently impaired HIF-1 α overload in response to hypoxia (Figs. 8A & C) and preserved SERCA2 mRNA (online Fig. S5A) and protein levels (Figs. 8A & D). As a second approach to determine the critical role of Pyk2 on SERCA2 depletion, we selectively knockdown Pyk2 by siRNA silencing. siRNA-

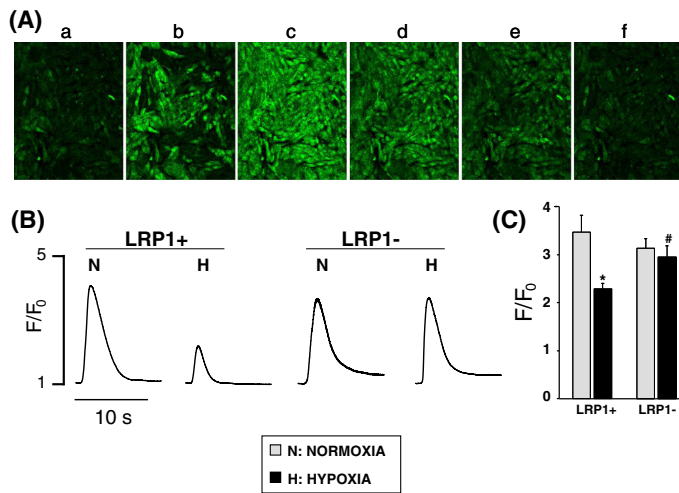


Fig. 5. Impact of LRP1 deficiency in the effect of hypoxia on calcium transient amplitude. (A) Representative image showing HL-1 calcium loading. (B) Representative calcium transient traces elicited by field stimulation at 0.5 Hz. (C) Bar graphs showing fluorescence values (F) normalized to the baseline fluorescence (F_0) and expressed as F/F_0 . Data from four independent experiments performed in triplicate are expressed as mean \pm SEM. N, normoxia; H, hypoxia. * $P < 0.05$ vs. normoxic cells, # $P < 0.05$ vs. LRP1+ cells.

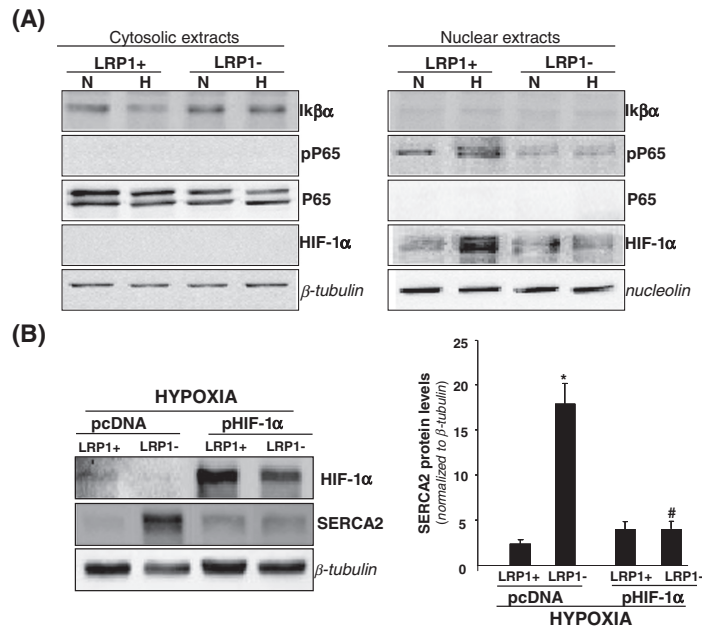


Fig. 6. Impact of LRP1 deficiency and HIF-1α overexpression in NF-κB/HIF-1α and SERCA2 protein levels under hypoxia. (A) Cytosolic and nuclear extracts revealed by Western blotting using specific antibodies against Iκβα, pP65, total P65 and HIF-1α. Nucleolin and β-tubulin were used as loading controls for cytosolic and nuclear extracts, respectively. (B) pcDNA and pHIF-1α transiently transfected-LRP1+ and LRP1- cells were exposed to hypoxia for 8 h. Representative Western blot analysis showing HIF-1α and SERCA2 bands and bar graphs showing the quantification of SERCA2 protein levels. β-Tubulin was also detected as loading control. Data from two independent experiments performed in triplicate are expressed as mean ± SEM. *P < 0.05 vs. LRP1+ cells; #P < 0.05 vs. pcDNA-transfected cells.

antiPyk2 completely inhibited Pyk2 protein levels in normoxic and hypoxic cells (Figs. 8E & F). Pyk2 inhibition completely prevented hypoxia-induced HIF-1α overaccumulation (Figs. 8E & G) and SERCA2 mRNA (online Fig. S5B) and protein (Figs. 8E & H) decay.

3.6. Human ischemic myocardium showed increased pPyk2 and reduced SERCA protein levels

Western blot analysis showed that LRP1 levels were significantly higher in ICM than in control hearts (ICM: 16.63 ± 1.89 vs control: 5.78 ± 0.77, P < 0.05) (Figs. 9A & B). Additionally, Pyk2 phosphorylation was significantly enhanced in ICM compared to control samples (ICM: 52.17 ± 7.08 vs control: 2.74 ± 0.70, P < 0.05) (Figs. 9A & C). In contrast, SERCA2 protein was strongly decreased in ICM compared to controls (ICM: 12 ± 2 vs control: 155 ± 12, P < 0.05) (Figs. 9A & D).

4. Discussion

4.1. Main findings

Despite the great relevance of SERCA2 in cardiac alterations associated with hypoxia, intracellular signalling pathways involved in the modulation of this key calcium-handling protein are largely unknown. Here, we explored LRP1-signalling pathways associated with SERCA2 depletion in cardiomyocytes exposed to hypoxia. The main finding of this study is that LRP1 mediates an upregulatory effect of hypoxia on Pyk2 phosphorylation and that LRP1/pPyk2 axis mediates SERCA2 downregulation via HIF-1α accumulation.

4.2. Impact of LRP1 deficiency on calcium-handling proteins and calcium-handling

Here, we show that specific silencing of LRP1, but not that of VLDLR or LDLR, prevents SERCA2 depletion induced by hypoxia. According to our calcium-handling experiments, the prevention of SERCA2 downregulation is sufficient to counteract the deleterious effect of hypoxia on the amplitude of the calcium transient resulting from caffeine induced SR calcium release. LRP1 deficiency, which normalizes SERCA2 levels, restores the calcium transient amplitude in hypoxic cardiomyocytes. Moreover, LRP1 deficiency does not modify the protein levels of pentameric PLN forms (either total or phosphorylated PLN). It has been recently reported that PLN pentamers, classically considered as a reservoir, facilitate the binding of monomers to SERCA2, regulating SERCA2 activity over a long term [32]. Results from the present study rule out that pentameric PLN-related mechanisms could contribute to the observed restoration of the SR calcium content in hypoxic LRP1 deficient cardiomyocytes. We also explored whether hypoxia modulates other ECC proteins including NCX-1 and CAV1.2. Our results reveal that hypoxia negatively modulates both NCX-1 and CAV1.2 in HL-1 cardiomyocytes both in LRP1+ and LRP1- cells, ruling out that these mechanisms intervene in the LRP1 mediated restoration of the SR calcium homeostasis in hypoxic myocytes. Previous studies have shown that chronic hypoxia upregulates CAV1.2 in pulmonary artery [33] and reduces PLN phosphorylation in the ventricle [34]. These divergent results may be explained, at least in part, by specific cell-type response to hypoxic conditions [14,35,36]. In contrast to the strong effect of LRP1 deficiency on SERCA2, LRP1 deficiency does not prevent the downregulatory effect of hypoxia on NCX-1 and CAV1.2. These results support a pivotal role of

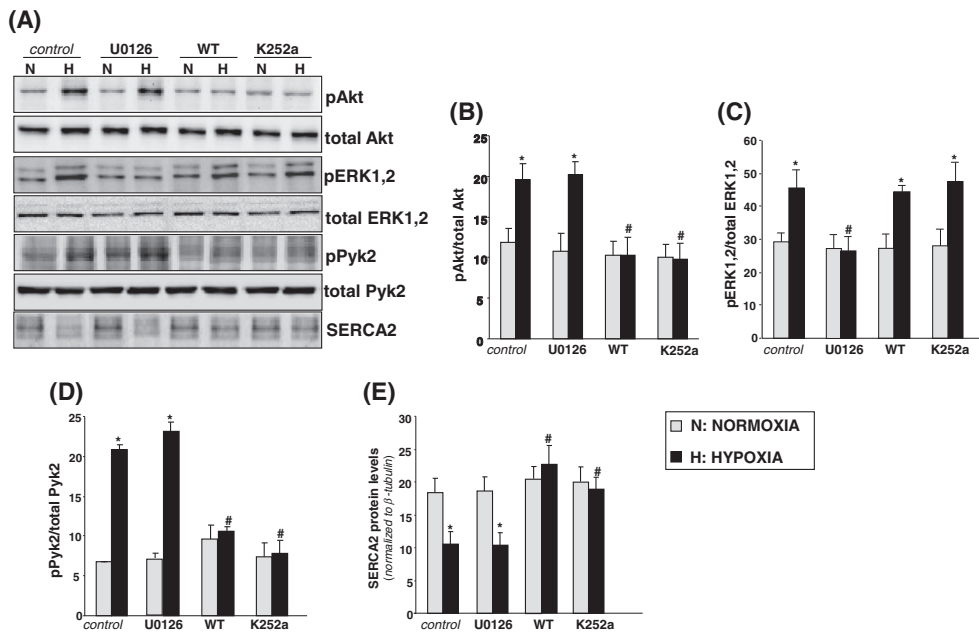


Fig. 7. Effect of U0126, Wortmannin and K252a on pAkt, pERK1,2, pPyk2 and SERCA2 protein levels in normoxic and hypoxic HL-1 cells. Quiescent cells were untreated or treated with U0126 (10 μ M), Wortmannin (WT) (100 nM) and K252a (15 μ M) for 4 h in normoxic or hypoxic conditions. (A) Representative Western blot analysis showing pAkt, total Akt, pERK1,2, total ERK1,2, pPyk2, total Pyk2 and SERCA2 bands. Bar graphs represent quantification of pAkt/total Akt (B), pERK1,2/total ERK1,2 ratio (C), pPyk2/total Pyk2 ratio (D) and SERCA2 (E) protein levels. Data from two experiments performed in triplicate are expressed as mean \pm SEM. N, normoxia; H, hypoxia. * $P < 0.05$ vs. normoxic cells, # $P < 0.05$ vs. control cells.

SERCA2 on the maintenance of calcium metabolism and are in agreement with the enormous potential of SERCA2 restoration by pharmacological action or gene delivery in the treatment of heart failure [37–39].

4.3. LRP1 signalling is linked to SERCA2 downregulation through Pyk2

Our results consistently show that hypoxia-dependent Pyk2 phosphorylation depends on LRP1 levels, in agreement with previous results in human vascular smooth muscle cells [14]. Pyk2 phosphorylation is mechanically induced by several hormones and growth factors that increase intracellular calcium levels [40]. However, it has been reported that hypoxia *per se* rapidly and persistently increases intracellular calcium [41]. Hypoxia also persistently upregulates LRP1 [26,42] and VLDLR [43,44] in cardiomyocytes. However, only LRP1 has the capacity to retain calcium in its fifth and sixth CR-domains (CR5 and CR6) [45]. Therefore, the crucial role of LRP1 on hypoxia-induced Pyk2 phosphorylation may be explained, at least in part, by elevated levels of LRP1, which in turn maintain a sustained increase in intracellular calcium levels. It is also important to remark that our previous immunoprecipitation experiments with anti-LRP1 β chain antibodies showed that pPyk2 physically interacts with LRP1 β chain under hypoxic conditions, and that hypoxia increases the amount of pPyk2 bound to the LRP1 β chain [14]. We consider therefore that, by increasing intracellular calcium, hypoxia enhances the capacity of LRP1 β chain to retain calcium and, by interacting with Pyk2, LRP1 increases the phosphorylation state of Pyk2.

LRP1 signalling cascade has been previously linked to ERK1,2 activation [46,47] and ERK1,2 activation has been associated with SERCA2 depletion in the context of cardiac hypertrophy [48]. Results

from the present study show that hypoxia transiently induces ERK1,2 phosphorylation but U0126, a MEK inhibitor, does not exert any effect on hypoxia-induced Pyk2 phosphorylation in HL-1 cardiomyocytes. These findings indicate that ERK1,2 does not participate in the activation of LRP1–pPyk2 axis under hypoxia. We also show that Wortmannin and K252a, which inhibit PI3K/Akt axis and tyrosine kinases, respectively, strongly decrease hypoxia-induced Pyk2 phosphorylation. In fact, we found that Akt phosphorylation is prevented in LRP1-deficient cells, indicating that Akt phosphorylation is linked to LRP1 in cardiomyocytes as previously described in neurons [49] and macrophages [50]. Taken together, these results show that LRP1-dependent Akt phosphorylation could be essential for hypoxia-induced Pyk2 phosphorylation. These results are in line with the previously described role of Pyk2 phosphorylation downstream of PI3K activation in response to integrin engagement [51]. However, other authors have shown that Pyk2 phosphorylation could be also a downstream mediator of PI3K activation in inflammatory and tumoral cells [52,53].

Here, we show that hypoxia steadily activates Pyk2 phosphorylation in HL-1 cells, as previously reported by us in human coronary vascular cells [14] and by others in rat aortic vascular cells [54] and U87 glioma cells [55]. Pyk2 activation has been reportedly associated with SERCA2 alterations in neonatal rat ventricular cardiomyocytes (NRVM) [12] and *in vivo* models of heart failure [13]. These results are controversial since both Pyk2 overexpression and Pyk2 depletion downregulate SERCA-2 mRNA expression in NRVM [11,12] and mice ventricle [13], respectively. Importantly, we showed by two different approaches, specific siRNAs and inhibitor treatments, that Pyk2 activation is essential for SERCA2 depletion in hypoxic cardiomyocytes. Therefore, our results

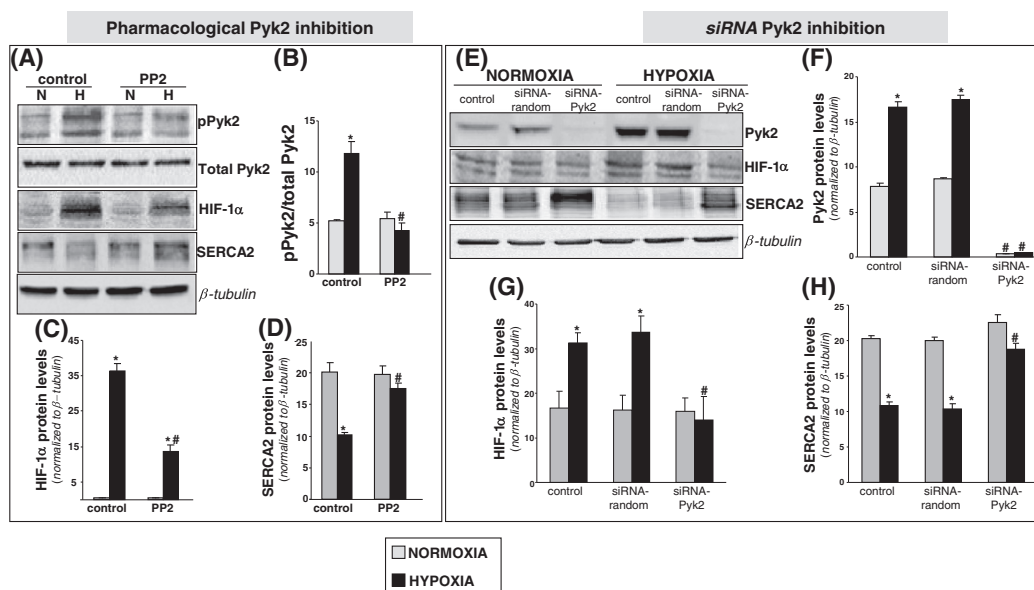


Fig. 8. Effect of specific Pyk2 abrogation on HIF-1 α and SERCA2 protein levels under hypoxia. Quiescent cells were untreated or treated with PP2 (50 μ M) for 4 h (pharmacological treatment) or were transfected with siRNA-random or siRNA-Pyk2 (0.6 μ mol/L) by nucleofection (siRNA treatment). (A, E) Representative Western blot analysis showing Pyk2, HIF-1 α and SERCA2 protein bands. β -Tubulin was detected as loading control. Bar graphs represent quantification of Pyk2 (B, F), HIF-1 α (C, G) and SERCA2 (D, H) protein levels. Data are expressed as mean \pm SEM of three independent experiments performed in triplicate. * P < 0.05 vs. normoxic controls, # P < 0.05 vs. control cells.

show that LRP1 modulates hypoxia-induced SERCA2 depletion through Pyk2 in HL-1 cardiomyocytes.

4.4. HIF-1 α overaccumulation requires Pyk2 phosphorylation and mediates SERCA-2 downregulation

Results from the present study show that hypoxia fails to induce HIF-1 α in LRP1-cells, siRNA-anti Pyk2 treated cells, and PP2-treated cells, indicating that LRP1/pPyk2 axis is essential for hypoxic induction of HIF-1 α accumulation. Moreover, by transfecting HL-1 cells with pHIF-1 α , we show that HIF-1 α overexpression abrogates SERCA2 in LRP1-deficient cardiomyocytes exposed to hypoxia. These results indicate that LRP1 deficiency maintains high SERCA2 levels through preservation of low HIF-1 α levels under hypoxia. These results are in agreement with previous studies showing that HIF-1 α negatively modulate SERCA2 levels in neonatal rat cardiomyocytes [56]. Ronkainen et al. reported two putative HIF-1 binding HRE-sites in SERCA2 promoter. Previous studies have suggested transcriptional associations between HIF-1 α and NF κ B. In particular, it has been previously shown that hypoxia-induced NF κ B may negatively modulate SERCA2 promoter either directly [48] or through activation of HIF-1 α [57]. It has also been shown that HIF-1 α promoter contains a NF κ B site [58], that HIF-1 α form transcriptional complexes with NF κ B [59], and that certain pro-inflammatory cytokines may regulate HIF-1 α levels through NF κ B [57]. Results from the present study show that hypoxic NF κ B induction requires LRP1 signalling in cardiomyocytes, as previously shown in human vascular smooth muscle cells [14]. Taken together, these results suggest that HIF-1 α and NF κ B could share signalling pathways and transcriptional mechanisms in hypoxic HL-1 cardiomyocytes. Indeed, further studies are required to know whether HIF-1 α overexpression depends or not on LRP1-mediated NF κ B activation.

4.5. Clinical implications

Summarized in Fig. 10, our results show that, by abrogating hypoxia-induced Pyk2 phosphorylation and HIF-1 α overaccumulation, LRP1 deficiency counteracts the deleterious effects of hypoxia on SERCA2 and calcium transient amplitude. Therefore, LRP1 emerges as a potentially crucial player in the modulation of hypoxia-induced arrhythmias.

Despite the negative effect of HIF-1 α on SERCA2 levels, increasing HIF-1 α stabilization in the heart reportedly protects against acute cardiac ischemia [60–62]. This cardioprotective effect is lost with long-term stabilization of HIF-1 α in different *in vivo* models [63,64]. Remarkably, while ischemia occurs rapidly, tissue hypoxia develops over a longer periods of time. Here, we show that human ischemic myocardium has higher pPyk2 and lower SERCA2 protein levels than control myocardium. Previous studies from our group have shown that both LRP1 and HIF-1 α are elevated in the human ischemic myocardium [42]. We have also previously shown that HIF-1 α upregulates LRP1 expression in cardiomyocytes [26]. Therefore, HIF-1 α may exert a paramount role in the maintenance of the feedback loop “LRP1 overexpression/SERCA depletion” under chronic hypoxia. This assumption is supported by our observation that SERCA2 preservation through cardiomyocyte LRP1 depletion is sufficient to maintain normal calcium transient amplitude under hypoxic conditions, and also by the fact that SERCA2 preservation is lost when HIF-1 α levels are kept elevated through pHIF-1 overexpression in LRP1-deficient cardiomyocytes. In this context, the modulation of LRP1/pPyk2/HIF-1 α -axis may be useful to counteract hypoxia-induced SERCA2 depletion, one of the main alterations underlying contractile dysfunction in humans [10,39]. In line with this, inhibition of Pyk2 signalling after myocardial infarction in rats has been reported to improve survival and left ventricular function [10]. Thus, further studies in specific *in vivo* models of chronic myocardial ischemia

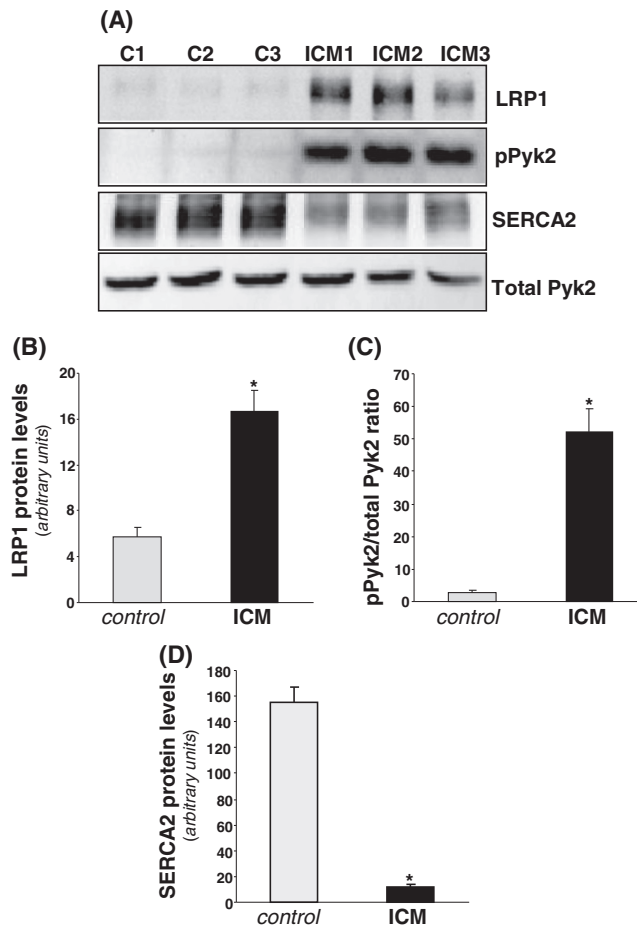


Fig. 9. Protein levels of LRP1, Pyk2 and SERCA2 in myocardium from control subjects and ischemic cardiomyopathy (ICM) patients. Representative Western blot analysis (A) showing LRP1, pPyk2, total Pyk2 and SERCA2 bands in the myocardium from three controls and three ICM patients. Bar graphs showing the mean \pm SD of protein LRP1 (B), pPyk2/total Pyk2 ratio (C) and SERCA2 (D) band quantification in the myocardium from control subjects (N = 4) and ICM patients (N = 6). * $P < 0.05$ vs. controls. ICM, ischemic cardiomyopathy patients.

are required to further explore the role of LRP1-signalling in cardiac function and its therapeutic potential in ischemic heart disease.

Sources of funding

This work was supported by funding from the Instituto Salud Carlos III (FIS PI11/00747, FIS PI14/01729 and FIS PI14/01682) co-financed by the European Fund for Regional Development (E.F.R.D.), and Red de Investigación Cardiovascular – RIC (RD 12/0042/0027 and RD 12/0042/0047). ERL is a receipt of FI-DGR_B01008 grant from the Generalitat de Catalunya and DdG of CD14/0109 Sara Borell from Instituto de Salud Carlos III.

Disclosures

None.

Abbreviations

- CAV1.2 voltage-dependent L-type $\alpha 1c$ -subunit
- HIF-1 α hypoxia inducible factor-1 α
- IP3R-I type I inositol 1,4,5-triphosphate receptors
- IP3R-II type II inositol 1,4,5-triphosphate receptors
- LDLR low density lipoprotein receptor
- LRP1 low-density lipoprotein receptor-related protein
- NCX $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger 1
- NF $\kappa\beta$ nuclear factor $\kappa\beta$
- PLN phospholamban
- Pyk2 Ca^{2+} -dependent nonreceptor protein tyrosine kinase (PTK)
- proline-rich tyrosine kinase 2
- ROS reactive oxygen species
- RyR2 ryanodine receptor
- SERCA2 sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase 2
- VLDLR very low density lipoprotein receptor
- WT Wortmannin

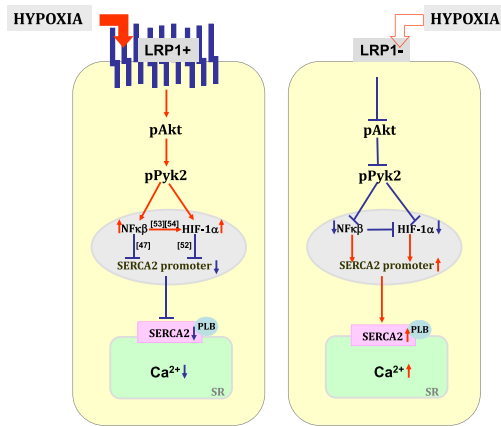


Fig. 10. Schematic representation of the LRP1-related signalling mechanisms involved in SERCA2 depletion in cardiomyocytes exposed to hypoxia. Left panel, we show that hypoxia activates LRP1/Akt/Pyk2 axis and overloads the nucleus with NFκβ and HIF-1α in LRP1 + cardiomyocyte. It has been previously shown that NFκβ activates HIF-1α promoter transcription (Ref. [54] & Ref. [55]) and that both NFκβ (Ref. [53]) and HIF-1α (Ref. [52]) represses SERCA2 promoter transcription. In line with these results, we show that hypoxia reduces SERCA2 levels, calcium transient amplitude and calcium levels in the endoplasmic reticulum in LRP1 + cardiomyocytes. Right panel, in LRP1 – cardiomyocytes, hypoxia fails to activate LRP1/Akt/Pyk2 axis, and to overload the nucleus with NFκβ and HIF-1α. In this situation, the levels of SERCA2 and calcium in the endoplasmic reticulum are maintained under hypoxic conditions.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmcc.2015.04.028>.

References

[1] Hasenfuss G, Pieske B. Calcium cycling in congestive heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 2002;34:951–69.
 [2] Gwathmey JK, Copelas L, MacKinnon R, Schoen FJ, Feldman MD, Grossman W, et al. Abnormal intracellular calcium handling in myocardium from patients with end-stage heart failure. *Circ Res* 1987;61:70–6.
 [3] del Monte F, Harding SE, Schmidt U, Matsui T, Kang ZB, Dec GW, et al. Restoration of contractile function in isolated cardiomyocytes from failing human hearts by gene transfer of SERCA2a. *Circulation* 1999;100:2308–11.
 [4] French JP, Quindry JC, Falk DJ, Staib JL, Lee Y, Wang KK, et al. Ischemia-reperfusion-induced calpain activation and SERCA2a degradation are attenuated by exercise training and calpain inhibition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;290:H128–36.
 [5] Nef HM, Mollmann H, Skwara W, Bolck B, Schwinger RH, Hamm C, et al. Reduced sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase activity and dephosphorylated phospholamban contribute to contractile dysfunction in human hibernating myocardium. *Mol Cell Biochem* 2006;282:53–63.
 [6] Miyamoto MI, del Monte F, Schmidt U, DiSalvo TS, Kang ZB, Matsui T, et al. Adenoviral gene transfer of SERCA2a improves left-ventricular function in aortic-banded rats in transition to heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:793–8.
 [7] Byrne MJ, Power JM, Provolos A, Mariani JA, Hajjar RJ, Kaye DM. Recirculating cardiac delivery of AAV2/1SERCA2a improves myocardial function in an experimental model of heart failure in large animals. *Gene Ther* 2008;15:1550–7.
 [8] Kawase Y, Ly HQ, Prunier F, Lebeche D, Shi Y, Jin H, et al. Reversal of cardiac dysfunction after long-term expression of SERCA2a by gene transfer in a pre-clinical model of heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2008;51:1112–9.
 [9] Schmidt U, del Monte F, Miyamoto MI, Matsui T, Gwathmey JK, Rosenzweig A, et al. Restoration of diastolic function in senescent rat hearts through adenoviral gene transfer of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *Circulation* 2000;101:790–6.
 [10] Prunier F, Kawase Y, Gianni D, Scapin C, Danik SB, Ellinor PT, et al. Prevention of ventricular arrhythmias with sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase pump overexpression in a porcine model of ischemia reperfusion. *Circulation* 2008;118:614–24.
 [11] Heidkamp MC, Scully BT, Vijayan K, Engman SJ, Szotek EL, Samarel AM. Pyk2 regulates SERCA2 gene expression in neonatal rat ventricular myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005;289:C471–82.
 [12] Lang D, Glukhov AV, Efimova T, Efimov IR. Role of Pyk2 in cardiac arrhythmogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011;301:H975–83.

[13] Bayer AL, Ferguson AG, Lucchesi PA, Samarel AM. Pyk2 expression and phosphorylation in neonatal and adult cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2001;33:1017–30.
 [14] Revuelta-López E, Castellano J, Roura S, Gálvez-Monton C, Nasarre L, Benítez S, et al. Hypoxia induces metalloproteinase-9 activation and human vascular smooth muscle cell migration through low-density lipoprotein receptor-related protein 1-mediated pyk2 phosphorylation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013;33:2877–87.
 [15] Betts GN, van der Geer P, Komives EA. Structural and functional consequences of tyrosine phosphorylation in the LRP1 cytoplasmic domain. *J Biol Chem* 2008;283:15656–64.
 [16] van der Geer P. Phosphorylation of LRP1: regulation of transport and signal transduction. *Trends Cardiovasc Med* 2002;12:160–5.
 [17] Zhang H, Lee JM, Wang Y, Dong L, Ko KW, Pelletier L, et al. Mutational analysis of the FXNPXY motif within LDL receptor-related protein 1 (LRP1) reveals the functional importance of the tyrosine residues in cell growth regulation and signal transduction. *Biochem J* 2008;409:53–64.
 [18] Geetha N, Mihalý J, Stockenhuber A, Blasi F, Uhrin P, Binder BR, et al. Signal integration and coincidence detection in the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (ERK) cascade: concomitant activation of receptor tyrosine kinases and of LRP-1 leads to sustained ERK phosphorylation via down-regulation of dual specificity phosphatases (DUSP1 and –6). *J Biol Chem* 2011;286:25663–74.
 [19] Ma Z, Thomas KS, Webb DJ, Moravec R, Salicioni AM, Mars WM, et al. Regulation of Rac1 activation by the low density lipoprotein receptor-related protein. *J Cell Biol* 2002;159:1061–70.
 [20] Yang M, Huang H, Li J, Li D, Wang H. Tyrosine phosphorylation of the LDL receptor-related protein (LRP) and activation of the ERK pathway are required for connective tissue growth factor to potentiate myofibroblast differentiation. *FASEB J* 2004;18:1920–1.
 [21] Loukinova E, Ranganathan S, Kuznetsov S, Gorlatova N, Migliorini MM, Loukinova D, et al. Platelet-derived growth factor (PDGF)-induced tyrosine phosphorylation of the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). Evidence for integrated co-receptor function between LRP and the PDGF. *J Biol Chem* 2002;277:15499–506.
 [22] Takayama Y, May P, Anderson RG, Herz J. Low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) controls endocytosis and c-CBL-mediated ubiquitination of the platelet-derived growth factor receptor beta (PDGFR beta). *J Biol Chem* 2005;280:18504–10.
 [23] Bacsikai BJ, Xia MQ, Strickland DK, Rebeck GW, Hyman BT. The endocytic receptor protein LRP also mediates neuronal calcium signalling via N-methyl-D-aspartate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:11551–6.
 [24] Nassar T, Akkawi S, Bar-Shavit R, Haj-Yehia A, Bdeir K, Al-Mehdi AB, et al. Human alpha-defensin regulates smooth muscle cell contraction: a role for low-density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor. *Blood* 2002;100:4026–32.
 [25] Castellano J, Aledo R, Sendra J, Costales P, Juan-Babot O, Badimon L, et al. Hypoxia stimulates low-density lipoprotein receptor-related protein-1 expression through hypoxia-inducible factor-1alpha in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;31:1411–20.
 [26] Cal R, Castellano J, Revuelta-López E, Aledo R, Barriga M, Farre J, et al. Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 mediates hypoxia-induced very low density lipoprotein-cholesterol ester uptake and accumulation in cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 2012;94:469–79.
 [27] Beitner-Johnson D, Ferguson T, Rust RT, Kobayashi S, Millhorn DE. Calcium-dependent activation of Pyk2 by hypoxia. *Cell Signal* 2002;14:133–7.
 [28] Claycomb WC, Lanson Jr NA, Stallworth BS, Egeland DB, Delcarpio JB, Bahinski A, et al. HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:2979–84.
 [29] White SM, Constantin PE, Claycomb WC. Cardiac physiology at the cellular level: use of cultured HL-1 cardiomyocytes for studies of cardiac muscle cell structure and function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;286:H823–9.
 [30] Barriga M, Cal R, Cabello N, Llach A, Vallmitjana A, Benítez R, et al. Low density lipoproteins promote unstable calcium handling accompanied by reduced SERCA2 and connexin-40 expression in cardiomyocytes. *PLoS One* 2013;8:e81828.
 [31] Swedberg K, Cleland J, Dargie H, Drexler H, Follath F, Komajda M, et al. Task Force for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure of the European Society of Cardiology. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure: executive summary (update 2005): The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2005;26:1115–40.
 [32] Wittman T, Lohse MJ, Schmitt JP. Phospholamban pentamers attenuate PKA-dependent phosphorylation of monomers. *J Mol Cell Cardiol* 2015;80:90–7.
 [33] Wan J, Yamamura A, Zimnicka AM, Voiriot G, Smith KA, Tang H, et al. Chronic hypoxia selectively enhances L- and T-type voltage-dependent Ca²⁺ channel activity in pulmonary artery by upregulating Cav1.2 and Cav3.2. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2013;305:L154–64.
 [34] Larsen KO, Sjaastad I, Svinland A, Krobert KA, Skjongsberg OH, Christensen G. Alveolar hypoxia induces left ventricular diastolic dysfunction and reduces phosphorylation of phospholamban in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;291:H507–16.
 [35] Vangesson G, Carr D, Federoff HJ, Rempe DA. The good, the bad, and the cell type-specific roles of hypoxia inducible factor-1 alpha in neurons and astrocytes. *J Neurosci* 2008;28:1988–93.
 [36] Chi JT, Wang Z, Nuyten DS, Rodriguez EH, Schaner ME, Salim A, et al. Gene expression programs in response to hypoxia: cell type specificity and prognostic significance in human cancers. *PLoS Med* 2006;3:e47.
 [37] Shareef MA, Anwer LA, Poizat C. Cardiac SERCA2A/B: therapeutic targets for heart failure. *Eur J Pharmacol* 2014;724:1–8.
 [38] Gwathmey JK, Yerevanian A, Hajjar RJ. Targeting sarcoplasmic reticulum calcium ATPase by gene therapy. *Hum Gene Ther* 2013;24:937–47.

- [39] Eisner D, Caldwell J, Trafford A. Sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase and heart failure 20 years later. *Circ Res* 2013;113:958–61.
- [40] Avraham H, Park SY, Schinkmann K, Avraham S. RAFTK/Pyk2-mediated cellular signalling. *Cell Signal* 2000;12:123–33.
- [41] Liu YV, Hubbi ME, Pan F, McDonald KR, Mansharamani M, Cole RN, et al. Calcineurin promotes hypoxia-inducible factor 1alpha expression by dephosphorylating RACK1 and blocking RACK1 dimerization. *J Biol Chem* 2007;282:37064–73.
- [42] Cal R, Juan-Babot O, Brossa V, Roura S, Gálvez-Montón C, Portoles M, et al. Low density lipoprotein receptor-related protein 1 expression correlates with cholesteryl ester accumulation in the myocardium of ischemic cardiomyopathy patients. *J Transl Med* 2012;10:160.
- [43] Castellano J, Farré J, Fernandes J, Bayés-Genis A, Cinca J, Badimon L, et al. Hypoxia exacerbates Ca(2+) -handling disturbances induced by very low density lipoproteins (VLDL) in neonatal rat cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2011;50:894–902.
- [44] Perman JC, Böstrom P, Lindbom M, Lidberg U, StAhlman M, Hagg D, et al. The VLDL receptor promotes lipotoxicity and increases mortality in mice following an acute myocardial infarction. *J Clin Invest* 2011;121:2625–40.
- [45] Andersen OM, Vorum H, Honore B, Thøgersen HC. Ca²⁺ binding to complement-type repeat domains 5 and 6 from the low-density lipoprotein receptor-related protein. *BMC Biochem* 2003;4:7.
- [46] Caceres LC, Bonacci GR, Sanchez MC, Chiabrando GA. Activated alpha(2) macroglobulin induces matrix metalloproteinase 9 expression by low-density lipoprotein receptor-related protein 1 through MAPK-ERK1/2 and NF-kappaB activation in macrophage-derived cell lines. *J Cell Biochem* 2010;111:607–17.
- [47] Webb DJ, Nguyen DH, Gonias SL. Extracellular signal-regulated kinase functions in the urokinase receptor-dependent pathway by which neutralization of low density lipoprotein receptor-related protein promotes fibrosarcoma cell migration and Matrigel invasion. *J Cell Sci* 2000;113(Pt 1):123–34.
- [48] Huang H, Joseph LC, Gurin MI, Thorp EB, Morrow JP. Extracellular signal-regulated kinase activation during cardiac hypertrophy reduces sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2 (SERCA2) transcription. *J Mol Cell Cardiol* 2014;75:58–63.
- [49] Fuentealba RA, Liu Q, Kanekiyo T, Zhang J, Bu G. Low density lipoprotein receptor-related protein 1 promotes anti-apoptotic signaling in neurons by activating Akt survival pathway. *J Biol Chem* 2009;284:34045–53.
- [50] Yancey PG, Blakemore J, Ding L, Fan D, Overton CD, Zhang Y, et al. Macrophage LRP-1 controls plaque cellularity by regulating efferocytosis and Akt activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30:787–95.
- [51] Melikova S, Dylla SJ, Verfaillie CM. Phosphatidylinositol-3-kinase activation mediates proline-rich tyrosine kinase 2 phosphorylation and recruitment to beta1-integrins in human CD34+ cells. *Exp Hematol* 2004;32:1051–6.
- [52] Chapman NM, Yoder AN, Barbón KM, Bilal MY, Connolly SF, Houtman JC. Proline-rich tyrosine kinase 2 controls PI3-kinase activation downstream of the T cell antigen receptor in human T cells. *J Leukoc Biol* 2015;97:285–96.
- [53] Cao J, Chen Y, Fu J, Qian YW, Ren YB, Su B, et al. High expression of proline-rich tyrosine kinase 2 is associated with poor survival of hepatocellular carcinoma via regulating phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway. *Ann Surg Oncol* 2013;20:S312–23.
- [54] Sato H, Sato M, Kanai H, Uchiyama T, Iso T, Ohyama Y, et al. Mitochondrial reactive oxygen species and c-Src play a critical role in hypoxic response in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 2005;67:714–22.
- [55] Mukhopadhyay D, Tsiokas L, Zhou XM, Foster D, Brugge JS, Sukhatme VP. Hypoxic induction of human vascular endothelial growth factor expression through c-Src activation. *Nature* 1995;375:577–81.
- [56] Ronkainen VP, Skoumal R, Tavi P. Hypoxia and HIF-1 suppress SERCA2a expression in embryonic cardiac myocytes through two interdependent hypoxia response elements. *J Mol Cell Cardiol* 2011;50:1008–16.
- [57] Jung YJ, Isaacs JS, Lee S, Trepel J, Neckers L. IL-1beta-mediated up-regulation of HIF-1alpha via an NFkappaB/COX-2 pathway identifies HIF-1 as a critical link between inflammation and oncogenesis. *FASEB J* 2003;17:2115–7.
- [58] Belaiba RS, Bonello S, Zähringer C, Schmidt S, Hess J, Kietzmann T, et al. Hypoxia up-regulates hypoxia-inducible factor-1alpha transcription by involving phosphatidylinositol 3-kinase and nuclear factor kappaB in pulmonary artery smooth muscle cells. *Mol Biol Cell* 2007;18:4691–7.
- [59] Yoshida T, Hashimura M, Mastumoto T, Tazo Y, Inoue H, Kuwata T, et al. Transcriptional upregulation of HIF-1alpha by NF-kappaB/p65 and its associations with beta-catenin/p300 complexes in endometrial carcinoma cells. *Lab Invest* 2013;93:1184–93.
- [60] Eckle T, Kohler D, Lehmann R, El Kasmi K, Eltzschig HK. Hypoxia-inducible factor-1 is central to cardioprotection: a new paradigm for ischemic preconditioning. *Circulation* 2008;118:166–75.
- [61] Holscher M, Silter M, Krull S, von Ahlen M, Hesse A, Schwartz P, et al. Cardiomyocyte-specific prolyl-4-hydroxylase domain 2 knock out protects from acute myocardial ischemic injury. *J Biol Chem* 2011;286:11185–94.
- [62] Hyvarinen J, Hassinen IE, Sormunen R, Maki JM, Kivirikko KI, Koivunen P, et al. Hearts of hypoxia-inducible factor prolyl 4-hydroxylase-2 hypomorphic mice show protection against acute ischemia-reperfusion injury. *J Biol Chem* 2010;285:13646–57.
- [63] Holscher M, Schafer K, Krull S, Farhat K, Hesse A, Silter M, et al. Unfavourable consequences of chronic cardiac HIF-1alpha stabilization. *Cardiovasc Res* 2012;94:77–86.
- [64] Lei L, Mason S, Liu D, Huang Y, Marks C, Hickey R, et al. Hypoxia-inducible factor-dependent degeneration, failure, and malignant transformation of the heart in the absence of the von Hippel-Lindau protein. *Mol Cell Biol* 2008;28:3790–803.

RESULTADOS

Lipoprotein Receptor Assays		Calcium Handling Protein Assays	
LRP1	Mm00464608_m1	SERCA-2	Rn01499537_m1
VLDLR	Rn01498166_m1	RyR2	Rn01470303_m1
LDLR	Mm01151339_m1	IP3-R1	Rn01425720_m1
		IP3-R1II	Rn00681974_m1

Table 1 online.

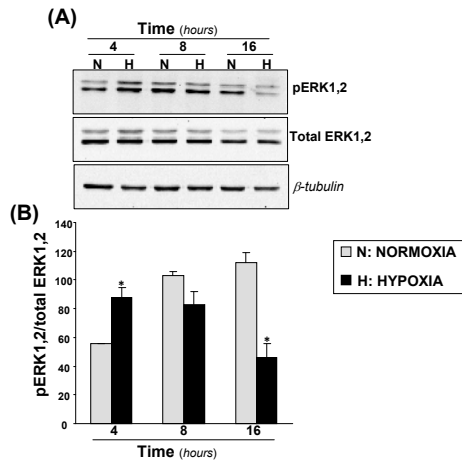


Figure S1. Time-course of hypoxia-induced ERK1,2 phosphorylation in HL-1 cardiomyocytes. HL-1 cells were exposed to either normoxia or hypoxia for 4, 8, and 16 hours. Representative Western blot analysis showing phosphorylated ERK1,2 (pERK1,2) and total ERK1,2 bands (A). Bar graphs show quantification of pERK1,2/total ERK1,2 ratio in normoxic (gray bars) and hypoxic (black bars) conditions. Results are expressed as mean \pm SEM of two independent experiments performed in triplicate. N, normoxia; H, hypoxia. * $P < 0.05$ vs. normoxic cells.

Figure S1

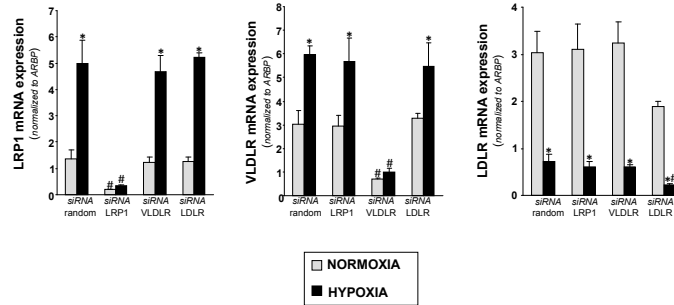


Figure S2. Specific abrogation of lipoprotein receptor (LRP1, VLDL and LDLR) by specific siRNAs. Quiescent HL-1 cells were specifically transfected with *siRNA*-random, *siRNA*-LRP1, *siRNA*-VLDLR and *siRNA*-LDLR (0.6 μmol/L) by nucleofection. HL-1 cells were exposed to normoxia or hypoxia and harvested at 16 hours to test LRP1, VLDLR and LDLR mRNA expression levels. Real-time PCR quantification of LRP1, VLDLR, and LDLR mRNA levels in cells exposed to normoxia or hypoxia for 24 hours. Data were processed with specially designed software based on threshold cycle (Ct) values, normalized to ARBP mRNA levels and expressed as mean ± SEM of two independent experiments performed in triplicate. **P*<0.05 vs. normoxic cells, #*P*<0.05 vs. *siRNA*-random HL-1 cells.

Figure S2

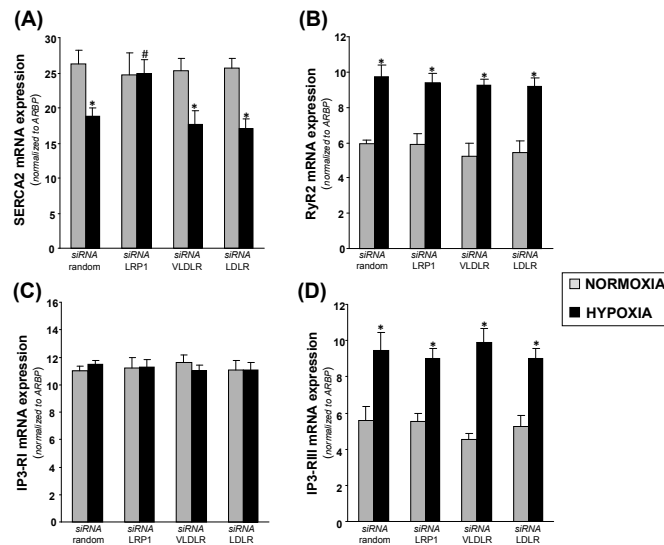


Figure S3. Effect of specific abrogation of LRP1 on the effect of hypoxia on calcium-handling genes. Real-time PCR quantification of SERCA2 (A), RyR2 (B), IP3-R1 (C) and IP3-R1III (D) mRNA levels in cells exposed to normoxia or hypoxia for 16 hours. Data were processed with specially designed software based on threshold cycle (Ct) values, normalized to ARBP mRNA levels and expressed as mean ± SEM of three experiments performed in duplicate. **P*<0.05 vs. normoxic cells, #*P*<0.05 vs. *siRNA*-random HL-1 cells.

Figure S3

RESULTADOS

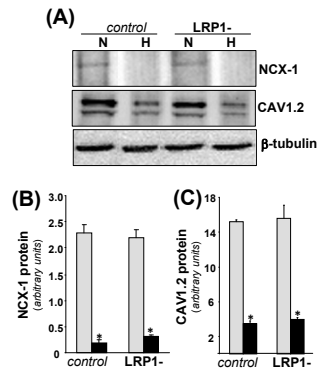


Figure S4. Impact of LRP1 deficiency in the effect of hypoxia on NCX-1 and CAV1.2. Stable cell lines corresponding to control (LRP1+) and LRP1-deficient (LRP1-) HL-1 cardiomyocytes were exposed to normoxic or hypoxic conditions for 16 hours. (A) Representative Western blot analysis showing protein levels of NCX-1 and CAV1.2 bands. Bar graphs represent quantification of NCX-1 (B) and CAV1.2 (C) protein levels. β -tubulin was detected as loading control. Data from four independent experiments performed in triplicate are expressed as mean \pm SEM. N, normoxia; H, hypoxia. * $P < 0.05$ vs. normoxic cells.

Figure S4

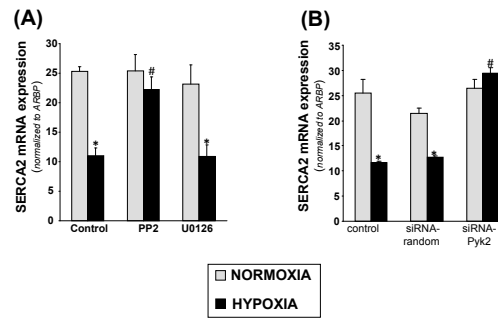


Figure S4 online. Effect of Pyk2 inhibition on SERCA2 mRNA expression in normoxic and hypoxic HL-1 cells. Real-time PCR quantification of SERCA2 in cells treated with PP2 (50 μ M) and U0126 (10 μ M) (A) or in cells treated with siRNA-Pyk2 or siRNA-random as control, and then exposed to normoxia or hypoxia for 16 hours. Data were processed with specially designed software based on threshold cycle (Ct) values, normalized to ARBP mRNA levels and expressed as mean \pm SEM of three experiments performed in duplicate. N: normoxia; H: hypoxia. * $P < 0.05$ vs. normoxic cells. # $P < 0.05$ vs. control cells

Figure S5

DISCUSIÓN

Los resultados aquí presentados demuestran que la sobreexpresión del receptor LRP1, mediante la activación de Pyk2, modula los niveles de proteínas claves en el remodelado vascular y función cardíaca tales como MMP-9 y SERCA2. Por tanto, la modulación del eje LRP1/pPyk2 podría tener aplicabilidad terapéutica en el tratamiento de la enfermedad cardiovascular.

ARTÍCULO 1

Hypoxia Induces Metalloproteinase-9 Activation and Human Vascular Smooth Muscle Cell Migration Through Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1-Mediated Pyk2 Phosphorylation

Respecto al remodelado vascular, nuestros resultados muestran que los niveles de fosforilación de Pyk2 (pPyk2) aumentan por hipoxia de forma dependiente de los niveles de LRP1 y que la existencia del eje LRP1/pPyk2 determina la activación de la MMP-9 y de la migración de hVSMCs por la hipoxia. Resultados previos de nuestro grupo muestran que las LDLag tienen la capacidad de disminuir la actividad de la MMP-9 y la migración de las hVSMCs [109]. Por tanto, los resultados del presente estudio podrían tener un alto impacto en el remodelado cuando no hay acumulación de lípidos de la pared vascular, como sucede en los aneurismas o en estadios tempranos de la aterosclerosis. Tanto el silenciamiento de LRP1 utilizando siRNAs específicos como la inhibición de la fosforilación de Pyk2 empleando PP2 previenen el remodelado vascular promovido por hipoxia. En particular, el silenciamiento del receptor LRP1 promueve un perfil pro-inflamatorio de las hVSMCs y por tanto sería importante desarrollar tratamientos que impidiesen el remodelado vascular sin promover la inflamación. Estos resultados sugieren que la migración de hVSMCs inducida por hipoxia depende de la expresión y/o activación de LRP1, Pyk2 y MMP-9 y que el receptor LRP1 podría jugar un papel importante en el remodelado vascular que se desarrolla en enfermedades vasculares asociadas a hipoxia.

Efecto de la hipoxia sobre la migración de hVSMCs

Trabajos anteriores de nuestro grupo han descrito que la hipoxia incrementa de forma significativa la expresión del receptor LRP1 en hVSMCs [162]. Lo relevante del trabajo presentado en esta tesis es que se describe la vía de señalización asociada al aumento del LRP1 por la hipoxia e involucrada en el remodelado vascular. En particular, la hipoxia

modula la fosforilación de Pyk2 de forma dependiente de LRP1 y la relación entre la hipoxia y el eje LRP1/pPyk2 difiere en humanos y ratón. Mientras que la hipoxia modula positivamente el eje LRP1/pPyk2 en hVSMCs, lo modula negativamente en mVSMC y HMDM. La AngII también incrementa la fosforilación de Pyk2 en hVSMCs, como se ha descrito previamente en VSMCs de aorta de rata [308, 309].

Previamente nuestro grupo ha descrito que tanto en hVSMCs como en cardiomiocitos HL-1, la sobreexpresión de LRP1 inducida por hipoxia está mediada por un aumento de los niveles del factor de transcripción HIF-1 α [162, 163]. La expresión de HIF-1 α depende de la concentración de Ca²⁺ intracelular, que incrementa rápidamente en respuesta a hipoxia [310, 311]. El incremento de Ca²⁺ intracelular por hipoxia se asocia a un aumento de la fosforilación de Pyk2 [210, 312]. En este trabajo la hipoxia aumenta la expresión de HIF-1 α en hVSMCs, mVSMCs y HMDM. Sin embargo, a pesar de la sobreexpresión de HIF-1 α en los tres tipos celulares en situación de hipoxia, la expresión de LRP1 y la fosforilación de Pyk2 solamente aumenta en hVSMCs. Mientras que en hVSMCs la hipoxia induce la sobreexpresión del eje LRP1/pPyk2, en mVSMCs y HMDM la hipoxia ejerce el efecto contrario, disminuyendo tanto la expresión de LRP1 como la fosforilación de Pyk2. El hecho de que la modulación del eje LRP1/pPyk2 por hipoxia sea opuesta en hVSMCs y mVSMCs tiene importantes implicaciones conceptuales. Este es un claro ejemplo de que los mecanismos moleculares asociados al remodelado vascular en situación de hipoxia no pueden extrapolarse directamente desde el modelo murino al humano. Otros grupos han descrito importantes diferencias entre modelos murinos y humanos en cuanto a la composición de la íntima arterial y morfología del vaso [313], la acumulación y formación de células espumosas [314] y la contribución de VSMCs y macrófagos en placas ateroscleróticas de estadios tempranos [315]. En cualquier caso, sería interesante descubrir porqué la sobreacumulación de HIF-1 α en mVSMCs no produce un incremento de pPyk2. En estudios previos, nuestro grupo describió que los factores de transcripción SREBPs modulan negativamente la expresión de LRP1 [160, 167]. En este trabajo mostramos que la hipoxia produce un descenso de los niveles de mRNA de SREBP-2 en hVSMCs y mVSMCs. De acuerdo con esto, esperaríamos un incremento de la expresión de LRP1 bajo condiciones de hipoxia en ambas especies, pero en mVSMC este efecto no se produce. Las secuencias SRE del promotor de LRP1 son homólogas en ratón y humanos, por lo que el efecto diferencial de la hipoxia en la modulación de LRP1 podría explicarse por la intervención de otros factores de transcripción que cooperan con la función de los SREBPs como Sp y KLF y cuyos niveles de expresión y actividad pueden ser diferentes en ratón y humanos.

Se ha descrito que el receptor LRP1 contribuye al incremento de Ca^{2+} intracelular que se requiere para la fosforilación de Pyk2 mediante su capacidad de retener Ca^{2+} en los dominios CR5-6 [316]. En este trabajo mostramos que la activación de MMP-9 depende de la fosforilación de Pyk2 ya que el tratamiento con PP2, un inhibidor de la fosforilación de esta quinasa, previene la inducción de MMP-9 por hipoxia. También hemos demostrado que la activación de MMP-9 depende del receptor LRP1, ya que la hipoxia no afecta la actividad de MMP-9 en hVSMCs deficientes en LRP1.

Además, hemos demostrado que el silenciamiento de LRP1 y el de MMP-9, y la inhibición de pPyk2, previene la migración de las hVSMCs inducida por hipoxia, revelando que el eje LRP1/pPyk2/MMP-9 es esencial en la migración de las hVSMCs expuestas a hipoxia.

Nuestros resultados muestran que la hipoxia induce un incremento de la expresión de mRNA y de la actividad de MMP-9 en hVSMCs, efecto que no se reproduce en presencia de LDLag. Este hallazgo concuerda con resultados previos de nuestro grupo que describen como las LDLag tienen la capacidad de reducir la actividad de MMP-9 y la migración de hVSMCs [109, 307]. Estos resultados sugieren que lesiones avanzadas donde las placas tienen un importante componente lipídico las hVSMCs tendrían menos capacidad migratoria en situación de hipoxia, y por tanto, menor capacidad para formar una cubierta fibrosa gruesa que establezca la lesión aterosclerótica. Esto sin duda podría contribuir a que la presencia de lípidos e hipoxia en la pared vascular, ambos factores con una gran influencia en la rotura de la placa aterosclerótica, las hVSMCs no respondieran a la hipoxia. La poca capacidad migratoria de las hVSMCs cargadas de lípido y por tanto su escasa capacidad de formar la cubierta fibrosa gruesa podría contribuir sin duda a la inestabilidad de la placa aterosclerótica.

Previamente nuestro grupo ha descrito que el LRP1 está sobreexpresado en placas ateroscleróticas humanas [159]. Los resultados del presente estudio muestran que la hipoxia induce pPyk2 en hVSMCs procedentes de lesión aterosclerótica y zona control sin aterosclerosis. Por tanto, el efecto que la hipoxia ejerce sobre Pyk2 es independiente del fenotipo aterosclerótico de las hVSMCs.

En cuanto a las mVSMCs, nuestros datos revelan que la migración celular no se modifica con la reducción de la actividad de MMP-9 inducida por la hipoxia. Sin embargo, la inhibición de la fosforilación de ERK1,2 mediante UO126 previene la migración celular en condiciones de hipoxia, sugiriendo que la fosforilación de ERK1,2 podría modular la

migración de mVSMCs independientemente de la actividad de MMP-9, distintamente a como ocurre en hVSMCs.

Efecto de la hipoxia sobre el perfil inflamatorio de hVSMCs

Otros grupos han descrito con anterioridad que Pyk2 se activa por ROS en células H9c2 de corazón de rata [235], macrófagos murinos [317] y VSMCs A10 [318]. Está descrito que la producción de ROS está relacionada con la sobreacumulación de HIF-1 α y el estrés oxidativo causado por la hipoxia [319, 320], y existen muchos estudios que muestran que en situaciones de isquemia, la emisión de H₂O₂ por parte de la mitocondria regula respuestas celulares asociadas a la hipoxia [321, 322]. Nuestros resultados muestran que en hVSMCs, la hipoxia incrementa la producción de ROS a la vez que activa pPyk2 y que en hVSMCs deficientes en LRP1 la producción de ROS no se altera. Sin embargo, la deficiencia de LRP1 produce un aumento de la liberación de IL-1 β , IL-6, y MCP-1 y no previene la reducción de citoquinas anti-inflamatorias causada por hipoxia, favoreciendo un fenotipo pro-inflamatorio de las hVSMCs. Estos datos concuerdan con otros resultados donde se describe un aumento de la expresión de mRNA de IL-1 β , IL-6, y MCP-1 en macrófagos deficientes en LRP1 [158]. Nuestros resultados sugieren que la deficiencia de LRP1 genera un fenotipo celular pro-inflamatorio en hVSMCs.

Por otro lado, la inhibición de pPyk2 con PP2 no incrementa la liberación de IL-1 β , IL-6, y MCP-1 y previene la reducción de la secreción de IL-10 inducida por hipoxia en hVSMCs. Aun así, sorprendentemente se produce un aumento de la expresión de mRNA de IL-1 β , IL-6, y MCP-1. Estos resultados sugieren que PP2 podría influenciar diferencialmente la síntesis y secreción de factores pro-inflamatorios. Existen trabajos que describen que PP2 participa en la producción de microRNAs que pueden estar implicados tanto en la secreción como en la liberación de citoquinas, pero se necesitan muchos más estudios para conocer los efectos que tiene el tratamiento con PP2 sobre la expresión y la secreción de las citoquinas en hVSMCs.

Se sabe que pPyk2 [323] y ROS [324] participan en la activación de NF- κ B bajo condiciones de hipoxia. El factor de transcripción NF- κ B regula genes que participan en estrés, crecimiento celular y respuestas inflamatorias [325, 326], y regula la supervivencia de cardiomiocitos en el miocardio isquémico [327]. Según describieron Gordon *et al*, el papel exacto de la familia de NF- κ B en el corazón es controvertido [328]. Nuestros resultados muestran que el tratamiento con PP2 bloquea completamente la activación de NF- κ B

inducida por hipoxia, lo que sugiere que NF- κ B participa activamente en la regulación de MMP-9 en hVSMCs. Por tanto, la activación del eje LRP1/pPyk2/NF- κ B es clave en la activación de MMP-9 por hipoxia en hVSMCs. Esta activación podría explicar el papel que juega NF- κ B en la patogénesis de los aneurismas [329].

En resumen, los resultados de este primer trabajo muestran que la activación del eje LRP1/pPyk2/NF- κ B por hipoxia es esencial para la sobreexpresión de MMP-9 y la migración de hVSMCs en situación de deficiencia de oxígeno. Por tanto proponemos que la actividad de MMP-9 y la migración de las VSMCs inducida por hipoxia está modulada a través del receptor LRP1.

CONCLUSIONES

1. La hipoxia induce la fosforilación de Pyk2 de forma dependiente de LRP1 en hVSMCs.
2. La hipoxia ejerce efectos contrapuestos en el eje LRP1/pPyk2 en hVSMCs y mVSMCs, demostrando que en cuanto al remodelado vascular asociado a hipoxia no se pueden extrapolar los mecanismos moleculares desde el modelo murino al humano.
3. El eje LRP1/pPyk2/NF- κ B es esencial en la activación de MMP-9 y la migración de hVSMCs en condiciones de hipoxia.
4. La deficiencia de LRP1 en hVSMCs reduce la capacidad migratoria de hVSMCs y por tanto juega un papel en el remodelado vascular, pero genera un fenotipo pro-inflamatorio.
5. El tratamiento con PP2 en hVSMCs reduce la capacidad migratoria de hVSMCs y no genera un perfil pro-inflamatorio, por lo que PP2 podría ser una potencial herramienta terapéutica en la prevención del remodelado vascular y la inflamación presentes en enfermedades vasculares asociadas a hipoxia.

ARTÍCULO 2**Cardiomyocyte intracellular cholesteryl ester accumulation promotes tropoelastin physical alteration and degradation. Role of LRP1 and CathepsinS.**

La TE es determinante en las respuestas cardiacas asociadas a estímulos mecánicos [330] por lo que las alteraciones en la estructura de la TE tienen consecuencias muy importantes en la funcionalidad cardiaca. La fragmentación de la TE incrementa la aterosclerosis [331] y modula la resistencia a la insulina [332]. La Cathepsina S (CatS), una de las principales proteasas que degrada la TE, participa en el remodelado de la MEC asociado a cardiomiopatía isquémica [252] e hipertensiva [333]. Nuestros datos demuestran que la captación de lipoproteínas aterogénicas por los cardiomiocitos produce acumulación intracelular de CE y que la acumulación intracelular de colesterol en los cardiomiocitos produce modificaciones en el patrón de secreción y en las características físicas de la TE. Además, mostramos que la acumulación intracelular de colesterol y las alteraciones de la TE no se producen en cardiomiocitos deficientes en LRP1 expuestos a lipoproteínas aterogénicas. También hemos demostrado que las alteraciones en la TE se deben a un aumento de los niveles de la forma madura de la CatS como respuesta a la acumulación intracelular de CE. De hecho, la inhibición de la CatS produce una recuperación del patrón original en forma de glóbulos de secreción de TE en cardiomiocitos. Estos resultados sugieren que la acumulación intracelular de CE en cardiomiocitos altera las características físicas de la TE secretada mediante un incremento de la CatS. Estas alteraciones en la tropoelastina podrían tener una gran relevancia en el remodelado cardiaco asociado a aquellas patologías que cursan con acumulación de lípidos en el miocardio tales como la cardiomiopatía isquémica y la diabética.

Efecto de la acumulación lipídica sobre la estructura de la TE

En este trabajo mostramos como la acumulación intracelular de CE derivada de lipoproteínas (VLDL+IDL) ricas en TG-CE y LDLag aumentan los niveles proteicos de CatS madura, alteran la estructura de los glóbulos de secreción de TE intracelular y las características físicas de la TE secretada por los cardiomiocitos. A su vez, mediante el silenciamiento del receptor LRP1, comprobamos que este receptor juega un papel esencial en la acumulación intracelular de CE y en el incremento de los niveles de CatS madura que alteran la TE.

Diferentes grupos, incluido el nuestro, han demostrado que el LRP1 participa en la captación selectiva de CE a partir de diferentes lipoproteínas [44, 163, 334, 335]. La captación selectiva de CE mediante el receptor LRP1 es un mecanismo que está altamente favorecido por la capacidad del LRP1 de interactuar con PGs y lipasas [334, 336], moléculas que promueven la retención y modificación de lipoproteínas [337]. Hay que remarcar que los cardiomiocitos captan el CE y los TG por mecanismos diferentes, mientras que el CE es aportado por las partículas VLDL mediante el receptor LRP1 [163], la acumulación de TG se lleva a cabo a través de la captación de AG por distintos transportadores de AG o mediante captación de lipoproteínas por el VLDL-r [338].

En este trabajo empleamos lipoproteínas ricas en TG-CE a concentraciones que imitan la concentración plasmática de estas lipoproteínas en pacientes con resistencia a la insulina o con hiperlipoproteinemia combinada. La composición y tamaño de las lipoproteínas influyen sus efectos biológicos.

Los fibroblastos poseen una gran capacidad de captar lipoproteínas [56], y son considerados el componente celular del miocardio con mayor capacidad de producir y secretar TE [339]. Sin embargo, nuestros resultados muestran que los cardiomiocitos también producen TE y que la acumulación intracelular de CE en los cardiomiocitos aumenta los niveles de CatS madura, lo que contribuye a alterar las características físicas y estructurales de la TE. La CatS se expresa como una proenzima no funcional cuya activación se produce en condiciones ácidas [249]. Excepcionalmente, la CatS puede permanecer catalíticamente activa en condiciones de pH neutro y es estable fuera del lisosoma. Los glucosaminoglicanos promueven el procesamiento autocatalítico de las proenzimas hacia sus formas maduras [340], aunque la CatS es capaz de autoactivarse [341]. La hyaluronato sintasa (HAS) es una glucosiltransferasa asociada a la membrana cuya actividad, modulada por la composición de colesterol de la membrana, modifica la estructura de los glucosaminoglicanos [342]. El cultivo de fibroblastos humanos en medio carente de lipoproteínas atenúa la síntesis de hyaluronato. Nuestros resultados muestran que las lipoproteínas VLDL+IDL inducen acumulación intracelular de CE y TG y que las LDLag inducen acumulación de CE, incrementando los niveles de CatS madura, mientras que en cardiomiocitos HL-1 en ausencia de lípido no se detecta CatS madura. La acumulación intracelular de CE podría incrementar la actividad de HAS y el contenido de hyaluronato, induciendo el procesamiento autocatalítico de CatS. Por lo tanto, este mecanismo podría explicar porqué sólo se detecta CatS madura en cardiomiocitos HL-1 tratados con VLDL+IDL y LDLag. Previamente, se ha demostrado que la acumulación intracelular de CE incrementa los niveles de CatS madura en hVSMCs [115] y macrófagos [343]. Se

necesita profundizar en los mecanismos que intervienen en el efecto del CE intracelular sobre los niveles de CatS madura en cardiomiocitos HL-1.

Nuestros resultados muestran que la CatS juega un papel esencial en los efectos deletéreos del CE intracelular procedente de la captación de partículas lipoprotéicas sobre las características de la TE ya que la inhibición de CatS previene las alteraciones estructurales de TE inducidas por VLDL+IDL y LDLag. Por lo tanto, nuestros datos indican que la acumulación intracelular de CE induce alteraciones estructurales en la TE a través del incremento de los niveles de CatS y dan soporte a la teoría de que la CatS participa activamente en el remodelado cardíaco [344].

Efecto de la acumulación lipídica sobre las características físicas de la TE

Nuestros resultados muestran que en los sobrenadantes de cardiomiocitos HL-1 existen dos temperaturas de transiciones vítreas Tg principales, lo cual indica que hay dos tipos de fases amorfas de la TE en los sobrenadantes purificados. Estos resultados concuerdan con los modelos de Tamburro y de Daggett's, que describen los dominios hidrofóbicos de la elastina como estructuras amorfas compactas. De acuerdo con estudios previos de nuestro grupo realizados con sobrenadantes de hVSMCs [115], la elevada temperatura de transición Tg2 de los sobrenadantes recolectados de cardiomiocitos HL-1 control, podría atribuirse a la estructura no agregada de la TE. Sin embargo, la acumulación de CE disminuye significativamente la temperatura de transición vítrea Tg2. Hay que señalar que en el caso de los cardiomiocitos HL-1 tratados con LDLag la Tg2 fue indetectable, lo que demuestra el efecto drástico que tienen las LDLag sobre la estructura física de la TE. De acuerdo con nuestros datos, este fenómeno de plasticidad se debe a la degradación parcial de la cadena de TE. La deficiencia de LRP1 y de CatS previenen la disminución de Tg2 producida y los defectos en la plasticidad de TE producidos por la captación de las lipoproteínas VLDL+IDL y LDLag. Estos resultados muestran que la CatS produce alteraciones físicas en la estructura globular de la TE debido a la acumulación intracelular de CE que deriva de la captación selectiva de CE desde las lipoproteínas proaterogénicas mediante el receptor LRP1.

La plasticidad de la TE contribuye a su fragmentación y a la formación de péptidos derivados de elastina. Se ha descrito previamente que estos péptidos derivados de la elastina tienen la capacidad de incrementar la aterosclerosis [331] y la resistencia a la insulina [332] en modelos *in vivo*. Además, se ha mostrado que una alta implicación de la CatS, clave en los

procesos de fragmentación de la TE en patologías con remodelado de la MEC tales como la cardiomiopatía dilatada [251], isquémica [252] e hipertensiva [253, 333].

En el modelo *in vivo* de diabetes, nuestros resultados muestran una acumulación significativa de lípidos neutros (CE y TG) en el miocardio de las ratas diabéticas. Así mismo, en este trabajo demostramos que los niveles de CatS madura y LRP1 están incrementados en el miocardio diabético. Además, el ratio FITR/AVR indica que la elastina de los corazones de las ratas diabéticas ha perdido parte de sus características estructurales asociadas a la elasticidad. En conjunto, estos resultados sugieren que la acumulación de CE en el miocardio diabético contribuye a la existencia de un remodelado miocárdico adverso asociado a un incremento de los niveles de CatS madura.

Nuestros resultados también muestran que una pequeña fracción lipídica permanece en los sobrenadantes tras su purificación y que las VLDL+IDL y LDLag no internalizadas causan alteraciones en las características físicas de la TE de cardiomiocitos independientemente de la expresión de LRP1 y los niveles de CatS. Las lipoproteínas pueden interactuar con componentes de la MEC y componentes del sobrenadante produciéndose modificaciones físicas estructurales [115, 345, 346]. Esto podría explicar la ausencia de transiciones térmicas puras de las partículas VLDL+IDL y LDLag que permanecen en los sobrenadantes y la reducción de la temperatura de transición vítrea Tg1. Previamente nuestro grupo había descrito en sobrenadantes de hVSMCs expuestas a lipoproteínas una asociación entre la reducción de Tg1 y TE no agregada [115]. La reducción de Tg1 podría también estar asociada con las modificaciones físicas estructurales del material elástico, aunque de acuerdo con nuestros resultados, las alteraciones físicas son independientes de LRP1 y de CatS.

En resumen, las lipoproteínas aterogénicas modifican las características físicas y estructurales de la TE a nivel extra- e intracelular. A nivel intracelular, el CE acumulado altera las características físicas de la TE y promueve su fragmentación al incrementar los niveles proteicos de CatS madura.

CONCLUSIONES

1. La acumulación intracelular de CE induce alteraciones físicas y estructurales en la TE miocárdica que podrían favorecer la rotura de la elastina de una forma dependiente del receptor LRP1

2. Los efectos deletéreos de la acumulación intracelular de CE en las características físicas y estructurales de la TE están mediados por la regulación al alza de los niveles de CatS madura.
3. Las alteraciones estructurales de los glóbulos de secreción de TE inducidas por la CatS favorecen la plasticidad de la TE y con ello su fragmentación.
4. El LRP1 juega un papel importante en las alteraciones físicas y estructurales de la TE a través de la CatS favoreciendo el remodelado cardíaco asociado a la esteatosis miocárdica.

ARTÍCULO 3

Hypoxia-driven sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2 (SERCA2) downregulation depends on low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1)-signalling in cardiomyocytes.

La supresión de SERCA2 es una de las principales características de la cardiomiopatía isquémica [181, 182] y la hipertrofia cardíaca [347] y una de las alteraciones que conduce a la fisiopatología del fallo cardíaco sistólico y diastólico [348, 349]. La implicación de SERCA2 en las alteraciones cardíacas asociadas a hipoxia es bien conocida. Sin embargo, las vías de señalización intracelular que modulan SERCA2 se desconocen en gran medida.

Rol del eje LRP1/pPyk2 en la depleción de SERCA2 por hipoxia

Previamente, nuestro grupo ha demostrado que la hipoxia incrementa pPyk2 de forma dependiente a la expresión de LRP1 [298]. Existe una gran controversia sobre la participación de Pyk2 en la modulación de SERCA2 [187, 188]. Sin embargo, los resultados de nuestro trabajo muestran que el LRP1 media el incremento de pPyk2 inducido por hipoxia y que el eje LRP1/pPyk2 está implicado en la reducción de los niveles de SERCA2 a través de la sobreacumulación de HIF-1 α producida por la hipoxia.

Nuestros resultados muestran que el silenciamiento del LRP1, pero no del VLDL-r o el LDL-r, previene la depleción de SERCA2 en cardiomiocitos expuestos a hipoxia. Sin embargo, el silenciamiento del LRP1 no altera el efecto de la hipoxia sobre otras proteínas relevantes en el manejo de la onda del Ca²⁺ como RyR2, IP3RI e IP3RIII. La deficiencia de LRP1 normaliza los niveles de SERCA2 y restaura la amplitud de la onda de liberación del Ca²⁺ en cardiomiocitos expuestos a hipoxia. Estos resultados demuestran que el mantenimiento de SERCA2 en cardiomiocitos expuestos a hipoxia es suficiente para impedir los efectos deletéreos de la hipoxia sobre la onda de liberación del Ca²⁺.

Recientemente se ha descrito que los pentámeros de PLN facilitan la unión de los monómeros a SERCA2 regulando de esta forma su actividad [350]. Nuestros resultados descartan que el pentámero de PLN contribuya a la restauración del contenido de Ca²⁺ sarcoplásmico en cardiomiocitos deficientes en LRP1 en condiciones de hipoxia, ya que la forma pentamérica de PLN no se ve alterada por la hipoxia o por la deficiencia de LRP1. En este trabajo también estudiamos como la hipoxia modula otras proteínas implicadas en la

homeostasis del Ca^{2+} , como NCX-1 y CAV1.2. Nuestros resultados revelaron que la hipoxia disminuye los niveles de NCX-1 y CAV1.2 de forma independiente de LRP1 en cardiomiocitos HL-1. Estudios previos han demostrado que la hipoxia crónica aumenta CAV1.2 en la arteria pulmonar [351] y disminuye la fosforilación de PLN en el ventrículo [352]. Nuestros resultados indican que la señalización del LRP1 está específicamente involucrada en la modulación de SERCA2 por hipoxia y que no participa en la regulación de otras proteínas implicadas en la homeostasis del Ca^{2+} . Además, nuestros datos demuestran que la restauración de SERCA2 es suficiente para restaurar el metabolismo del Ca^{2+} en los cardiomiocitos HL-1. Nuestros datos están en concordancia con el enorme potencial que tiene la restauración farmacológica de SERCA2 en el tratamiento del fallo cardíaco [353-355].

Tal como había sido descrito previamente por nuestro grupo en hVSMC [298], la hipoxia induce la fosforilación de Pyk2 de forma dependiente de LRP1 en cardiomiocitos. Varias hormonas y factores de crecimiento inducen la fosforilación de Pyk2 incrementando los niveles de Ca^{2+} intracelular [228]. La hipoxia por sí misma incrementa los niveles de Ca^{2+} intracelular [310]. En cardiomiocitos HL-1, la hipoxia produce sobreexpresión de LRP1 [163, 295] y de VLDL-r [202, 356], aunque únicamente el receptor LRP1 retiene Ca^{2+} en sus dominios CR5 y CR6 [316]. Por tanto, el LRP1 podría regular pPyk2 por su capacidad de mantener altos los niveles de Ca^{2+} intracelular. Ensayos de inmunoprecipitación previamente realizados por nuestro grupo en hVSMCs demostraron que existe una interacción física entre la cadena β de LRP1 y pPyk2, y que el número de complejos que se forman por la interacción de LRP1 y pPyk2 aumentaban en hipoxia [298]. Por ello, sugerimos que la hipoxia incrementa la capacidad de LRP1- β para retener Ca^{2+} facilitando la fosforilación de Pyk2.

Previamente, la cascada de señalización de LRP1 se ha asociado a la activación de ERK1,2 [357] y la activación de ERK1,2 a su vez con la reducción de SERCA2 en la hipertrofia cardíaca [347]. Nuestros datos muestran que la hipoxia induce de forma transitoria la fosforilación de ERK1,2 en cardiomiocitos HL-1. Sin embargo, el tratamiento con UO126, un inhibidor de la fosforilación de ERK1,2, no ejerce ningún efecto sobre la fosforilación de Pyk2. Estos datos indican que ERK1,2 no participa en la activación del eje LRP1/pPyk2 por hipoxia. A su vez mostramos que la inducción de pPyk2 por hipoxia no se produce al inhibir el eje PI3K/Akt y la actividad de las tirosín quinasas mediante Wortmannin y K252a, respectivamente. También demostramos que la fosforilación de Akt no se produce en los cardiomiocitos HL-1 deficientes en LRP1, tal y como se había descrito

en neuronas [358] y macrófagos [359]. Todos estos resultados sugieren que se requiere la fosforilación de Akt, dependiente de LRP1, para inducir pPyk2.

Nuestros resultados demuestran que la hipoxia induce la fosforilación de Pyk2 en cardiomiocitos HL-1, tal como ya habíamos descrito en hVSMCs [298] y otros grupos en células vasculares de aorta de rata [360] y células de glioma U87 [361]. La activación de Pyk2 se asocia con alteraciones en la función de SERCA2 en cardiomiocitos ventriculares de ratas neonatales (NRVM) [187]. Existe controversia en la modulación de SERCA2 por Pyk2. Se ha descrito que tanto la sobreexpresión de Pyk2 en NRVM [362] como la deficiencia de Pyk2 en ventrículo de ratón [363] son capaces de disminuir la expresión de SERCA2. Sin embargo, en nuestro trabajo describimos que la activación de Pyk2 causa la depleción de SERCA2 en cardiomiocitos hipóxicos. Demostramos que la inhibición de pPyk2 con inhibidores específicos y el silenciamiento de Pyk2 con un siRNA específico previenen la depleción de SERCA2 por hipoxia. Nuestros resultados muestran que bajo condiciones de hipoxia el receptor LRP1 modula la reducción de la actividad de SERCA2 a través de Pyk2.

Efecto del eje LRP1/pPyk2/ HIF-1 α sobre la depleción de SERCA2 por hipoxia

Este trabajo también describe la activación de la vía de señalización de NF κ B a través del receptor LRP1 por hipoxia en cardiomiocitos HL-1. La hipoxia promueve un descenso de los niveles citosólicos de I κ B α que se traducen en la translocación de P-p65 al núcleo, efecto que no se observa en cardiomiocitos deficientes en LRP1. La hipoxia modula negativamente SERCA2 a través de la inducción de NF κ B [347] o a través de la activación de HIF-1 α [364]. También se ha demostrado que el promotor de HIF-1 α contiene sitios de unión para NF κ B [365], que NF κ B y HIF-1 α forman complejos transcripcionales [366] y que algunas citoquinas pro-inflamatorias pueden regular los niveles de HIF-1 α a través de NF κ B [364]. Nuestros resultados muestran que la hipoxia no incrementa los niveles de HIF-1 α en cardiomiocitos deficientes en LRP1 o Pyk2, por lo que el eje LRP1/pPyk2 es esencial para la acumulación de HIF-1 α en hipoxia. Además, nuestros datos muestran que la sobreexpresión de HIF-1 α revierte el efecto protector de la deficiencia de LRP1 y produce reducción de SERCA2. Nuestros datos sugieren que la deficiencia de LRP1 en cardiomiocitos mantiene altos niveles de SERCA2 al impedir que aumente HIF-1 α por hipoxia. Estos resultados están de acuerdo con la modulación negativa de SERCA2 por HIF-1 α mostrada por Ronkainen *et al* en cardiomiocitos neonatales de rata [281]. Los datos obtenidos en nuestro tercer artículo sugieren que NF κ B y HIF-1 α podrían compartir

mecanismos transcripcionales y vías de señalización en cardiomiocitos HL-1 expuestos a hipoxia y que la activación del eje Pyk2/ HIF-1 α es esencial para la depleción de los niveles de SERCA2 en hipoxia.

CONCLUSIONES

1. SERCA2 juega un papel crucial en el mantenimiento de la homeostasis del Ca²⁺ en cardiomiocitos HL-1.
2. La hipoxia induce la fosforilación de Pyk2 a través del receptor LRP1 y reduce los niveles de SERCA2 mediante la activación del eje LRP1/pPyk2/ HIF-1 α en cardiomiocitos HL-1. La modulación de este eje podría ser una potencial herramienta para impedir la depleción de SERCA2 inducida por hipoxia, una de las alteraciones más importantes en la disfunción contráctil.
3. La deficiencia de LRP1 elimina los efectos deletéreos de la reducción de SERCA2 por la hipoxia, por lo que el LRP1 podría participar de una forma fundamental en la modulación de las arritmias cardíacas asociadas a hipoxia.

IMPLICACIONES CLÍNICAS GENERALES

Resultados previos de nuestro grupo describen que en condiciones de hipoxia el receptor LRP1 está sobreexpresado en hVSMCs y cardiomiocitos HL-1 pudiendo jugar un papel importante en el remodelado vascular y cardíaco. Los resultados de esta tesis muestran que la hipoxia induce la fosforilación de Pyk2 de una forma dependiente de la expresión del receptor LRP1 demostrando la existencia de un eje LRP1/pPyk2. Así mismo, también se demuestra que este eje media la sobreacumulación de HIF-1 α en ambos tipos celulares.

La hipoxia aumenta la actividad de MMP-9 induciendo un remodelado vascular que podría tener un alto impacto en la pared vascular cuando todavía no hay presencia de lípidos modificados, como ocurre en estadios tempranos de la aterosclerosis o en aneurismas, donde la proliferación y la migración de las hVSMCs es un evento crucial. Además, otro efecto fisiopatológico de la hipoxia es que promueve el proceso inflamatorio. Principalmente hay que señalar que la hipoxia a través del eje LRP1/pPyk2/NF κ B promueve remodelado vascular mediante la activación de MMP-9 y la migración de las hVSMCs, además de favorecer un fenotipo pro-inflamatorio de las hVSMCs. El silenciamiento específico de LRP1 reduce el remodelado vascular debido a que atenúa la activación de MMP-9 y la migración celular inducida por la hipoxia pero en contraposición genera una potente respuesta inflamatoria al inducir la secreción de IL-1 β , IL-6 y MCP-1. Por otro lado, la inhibición de la fosforilación de Pyk2 mediante PP2 reduce el remodelado vascular al igual que el silenciamiento de LRP1, pero no induce secreción de interleuquinas pro-inflamatorias y previene la reducción de los niveles de IL-10 asociados a hipoxia. Nuestros resultados sugieren que el PP2 podría tener potencial terapéutico en la prevención del remodelado vascular y la inflamación asociadas a la hipoxia. Se necesitan estudios *in vivo* para analizar el efecto potencial de PP2 sobre remodelado vascular e inflamación en situación de hipoxia.

El estrés del RS inducido por la isquemia genera remodelado cardíaco [367]. Nuestros resultados muestran que el eje LRP1/pPyk2/HIF-1 α participa en la reducción de los niveles de SERCA2 en cardiomiocitos hipóxicos. La restauración de los niveles de SERCA2 farmacológicamente tiene un gran potencial en el tratamiento del fallo cardíaco [353]. Los resultados de este trabajo muestran que la deficiencia de LRP1 previene la reducción de SERCA2 por hipoxia y mejora la amplitud de la onda del Ca²⁺. Es por ello que LRP1 podría ser una diana potencial para controlar las arritmias asociadas a hipoxia en el miocardio isquémico y prevenir el remodelado cardíaco asociado a este tipo de patologías.

A pesar del efecto negativo que la sobreacumulación de HIF-1 α produce en los niveles de SERCA2, Eckle *et al* describieron en el 2008 que la estabilización de HIF-1 α es esencial en la protección que el IP (del inglés *Ischemic preconditioning*) confiere al miocardio con isquemia aguda [368]. El efecto cardioprotector de HIF-1 α implica cambios en el tono vascular, en el metabolismo energético y en el manejo del Ca²⁺. Sin embargo, la activación de HIF-1 α durante largos periodos de tiempo es perjudicial. Pequeñas activaciones de HIF-1 α son beneficiosas en determinadas estrategias terapéuticas, pero activaciones más prolongadas conllevan el desarrollo de cardiomiopatías [369]. Previamente nuestro grupo ha demostrado que los niveles de LRP1 y HIF-1 α están incrementados en el miocardio isquémico humano [295] y que HIF-1 α aumenta la expresión de LRP1 en cardiomiocitos [163]. Los resultados de este trabajo muestran que el miocardio humano isquémico tiene niveles altos de pPyk2 y reducidos de SERCA2. Además, la deficiencia de LRP1 es suficiente para restaurar los niveles de SERCA2 manteniendo una correcta amplitud de la onda de Ca²⁺ bajo condiciones de hipoxia. También mostramos que la restauración de los niveles de SERCA2 por la deficiencia de LRP1 se pierden cuando los niveles de HIF-1 α se mantienen elevados a través de la sobreexpresión de HIF-1 α . Todo ello sugiere que HIF-1 α podría participar activamente en la asociación entre la sobreexpresión de LRP1 y la reducción de los niveles de SERCA2 y que la inhibición del eje LRP1/pPyk2/HIF-1 α podría contrarrestar la reducción de los niveles de SERCA2 inducidos por hipoxia. Existen estudios en ratas que describen que la inhibición de Pyk2 tras un infarto de miocardio mejora la función ventricular y aumenta el índice de supervivencia [185].

A parte de las alteraciones producidas en el manejo del Ca²⁺ por hipoxia, las alteraciones físicas y estructurales de la TE inducidas por la acumulación de CE en el miocardio, empeoran a su vez el remodelado cardíaco asociado al daño miocárdico. Estudios previos de nuestro grupo revelaron que en hVSMCs la acumulación lipídica producía alteraciones en los niveles de TE y en sus propiedades mecánicas y elásticas. En el presente trabajo describimos que en cardiomiocitos HL-1, al igual que ocurría en las hVSMCs, la acumulación intracelular de CE altera las características físicas de la TE y promueve su fragmentación mediante el incremento de los niveles de CatS, favoreciendo el remodelado cardíaco asociado a la esteatosis miocárdica.

Aun así, más estudios en modelos animales son necesarios para explorar el papel que juega el LRP1 en la función cardíaca y descubrir su posible potencial terapéutico en el remodelado cardíaco asociado al miocardio isquémico y a la esteatosis miocárdica.

APÉNDICE

A continuación se citan otras publicaciones en las que la doctorando Elena Revuelta López ha participado a lo largo del periodo de su tesis doctoral. La participación en estos trabajos ha permitido una mejor formación investigadora para la doctorando.

1. **Revuelta-López E**, Cal R, Julve J, Rull A, Martínez-Bujidos M, Perez-Cuellar M, Ordoñez-Llanos J, Badimon L, Sanchez-Quesada JL, Llorente-Cortés V. *Hypoxia worsens the impact of intracellular triglyceride accumulation promoted by electronegative low-density lipoprotein in cardiomyocytes by impairing perilipin 5 upregulation.* Int J Biochem Cell Biol. 2015 Aug; 65:257-67.

Factor de impacto: 4.046

2. Costales P, Fuentes-Prior P, Castellano J, **Revuelta-López E**, Corral-Rodríguez MÁ, Nasarre L, Badimon L, Llorente-Cortés V. *K Domain CR9 of Low Density Lipoprotein (LDL) Receptor-related Protein 1 (LRP1) Is Critical for Aggregated LDL-induced Foam Cell Formation from Human Vascular Smooth Muscle Cells.* J Biol Chem. 2015 Jun 12; 290(24):14852-65.

Factor de impacto: 4.573

3. Roura S, Cal R, Gálvez-Montón C, **Revuelta-López E**, Nasarre L, Badimon L, Bayes-Genis A, Llorente-Cortés V. *Inverse relationship between raft LRP1 localization and non-raft ERK1,2/MMP9 activation in idiopathic dilated cardiomyopathy: potential impact in ventricular remodeling.* Int J Cardiol. 2014 Oct 20;176(3):805-14.

Factor de impacto: 6.175

4. **E. Revuelta-López**, J. Castellano, D. de Gonzalo-Calvo, L. Nasarre, L. Badimon, and V. Llorente-Cortés. *Differential Effect of Hypoxia in Human and Mouse Vascular Smooth Muscle Cell Migration through LRP1-pPyk2-MMP-9 Axis.* Hindawi. Conference Papers in Science. Volume 2015 (2015), Article ID 283909, 9 pages

5. de Gonzalo-Calvo D, **Revuelta-López E**, Llorente-Cortés V. *Basic mechanisms. Regulation and clearance of lipoproteins that contain apolipoprotein B.* Clin Investig Arterioscler. 2013 Sep-Oct;25(4):194-200.

6. Costales P, Castellano J, **Revuelta-López E**, Cal R, Aledo R, Llampayas O, Nasarre L, Juarez C, Badimon L, Llorente-Cortés V. *Lipopolysaccharide downregulates CD91/low-density lipoprotein receptor-related protein 1 expression through SREBP-1 overexpression in human macrophages.* Atherosclerosis. 2013 Mar;227(1):79-88.

Factor de impacto: 3.994

7. Cal R, García-Arguinzonis M, **Revuelta-López E**, Castellano J, Padró T, Badimon L, Llorente-Cortés V. *Aggregated low-density lipoprotein induces LRP1 stabilization through E3 ubiquitin ligase CHFR downregulation in human vascular smooth muscle cells*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013 Feb;33(2):369-77.

Factor de impacto: 5.533

8. Cal R, Castellano J, **Revuelta-López E**, Aledo R, Barriga M, Farré J, Vilahur G, Nasarre L, Hove-Madsen L, Badimon L, Llorente-Cortés V. *Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 mediates hypoxia-induced very low density lipoprotein-cholesterol ester uptake and accumulation in cardiomyocytes*. *Cardiovasc Res*. 2012 Jun 1;94(3):469-79.

Factor de impacto: 5.808

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

La primera persona a la que he de agradecer esta tesis es a Vicenta Llorente. Gracias por tu voto de confianza, por contagiarme tu entusiasmo por la ciencia y por haberme enseñado, apoyado y dirigido durante estos 4 años de la forma que lo has hecho. He tenido mucha suerte de que hayas sido mi directora.

En segundo lugar quiero expresar mi más sincero agradecimiento a la Profesora Lina Badimon por permitirme realizar mi tesis doctoral en este centro de investigación.

Y ahora... Poc a poc y bona lletra porque viene mucha gente, aunque el 111 va por delante. El 111 ha sido mi segundo hogar durante todo este tiempo, podría escribir otra tesis entera llena de historias y anécdotas de todo lo vivido, y de dedicatorias y agradecimientos hacia la gente que he conocido en este laboratorio.

Laura, ¿qué quieres que te diga que no sepas ya? Me has enseñado todo lo que sé, incluida la CCF, la técnica definitiva de la cual parecía que me iba a escaquear!!! Si hubiera habido un plan de Letsbonus para aprenderla seguro que la hubiera aprendido más rápido! Laboralmente ha sido genial compartir esta experiencia contigo, el buen rollo, la música, las compras impulsivas y las conversaciones que arreglaban la ciencia y el mundo (aunque a veces no nos entendieramos con el castellano antiguo). Y fuera de aquí... justo hoy en la comida hablábamos de que los verdaderos amigos se cuentan con los dedos de una mano, gracias por estar entre los míos.

David, gracias por transmitirme tu experiencia, por tus consejos (aunque no lo creas te escuchaba!) y enseñarme a ser más eficiente con el Endnote. Tendré que traer unas berlinas un día de estos!

Esa gente que ha pasado por el 111 y que parece que todavía sigue por aquí....

Tenías razón Roi, a pesar de que ya no vuelan guantes por el 111 y que estamos tranquilas sin escuchar la cabritiña, te estamos echando de menos!! Las HL-1 seguro que también lo hacen! Me has dejado sola ante el peligro con ellas... qué poca vergüenza que tienes, de Vigo tenías que ser! Fuera bromas, gracias, fue genial ser predocs juntos, trabajar codo con codo y aprender contigo, fuiste un compañero genial.

Jose, cuando llegué estabas en pleno proceso de escritura, pero aún así tuviste tiempo para enseñarme ciencia y ampliar mi cultura musical, aunque al final no hicimos la fiesta heavy en el Bharna!

AGRADECIMIENTOS

Y Marta, no sé que tipo de derivación hiciste de mi nombre para terminar llamándome Nufi, pero me encanta! Los días que pasamos juntas en el labo y al final cuando compartíamos poyata fueron muy buenos, aunque nos quedaron muchas cosas por hacer... listas por colgar y congas que iniciar...

Fuera del 111 también he conocido a mucha gente y compartido muy buenos momentos. Sandra, nos parecemos tanto que agradecerte algo sería como darme las gracias a mí misma! Pero gracias! Gracias por estar ahí, en el labo, en las comidas y en la maquetación de esta tesis, que sin ti no sé muy bien como hubiera quedado! María, hace mucho tiempo que no bajas a merendar, pero al menos en las comidas seguimos investigando sobre mil temas y ampliando nuestra topicultura.

Por parte del estabulario tengo que agradecerle a Laura Casaní el tiempo compartido entre gorros y mascarillas. Sergi, gracias por ayudarme siempre que lo he necesitado, espero que hayas llenado ya la pared con todas las tarjetas que te he ido regalando! Y Angel, gracias por cuidar tan bien de mis bichines y el buen rollo, nunca olvidaré aquel paseo en coche al PRBB!

Y dentro del centro... sois tantos... gracias a toda la gente del 110, Mar, Ingrid, Judith, Saray, María y Silvia mis vecinas! En cultivos a Nia y a Esther, en las noches de transplantes a Oriol y Maribel, a Rosa Aledo por nuestros tiempos chipeando y las lucis, Huertas, Olaya, Josep, Maisa, Ana, Montse, Maite, Raquel, Mónica, Loli, Adela, Carmen, gente de administración y a toda esa gente con la que he coincidido en el ICCC y con la que he compartido trabajo, charlas y experiencias.

Esta tesis no sólo la ha vivido la gente del centro... tengo amigos que me han estado aguantado mucho y los cuales piensan que todo esto lo he conseguido dando vueltas a las cosas... Lumbe, gracias por todos tus buenos días antes de entrar al laboratorio, has fallado muy pocos días! Gracias por irme completando la lista del spoty para que la escritura se me hiciera más amena y por estar ahí siempre que te he necesitado. Fry, nos vamos acercando a los 7 años... ya no nos libramos de ser amigos para siempre! Seguirás escuchando nombres raros científicos toda la vida! Y Xavi, mi psicólogo personal, gracias... fíjate, lo he conseguido! Ya está hecho, con terapia de por medio pero hecho! Ay... mi trío maravilla! Chicos, sin vosotros esta tesis hubiera sido imposible, más que nada porque fuisteis vosotros los que me convencisteis de venir a Barcelona y no me arrepiento para nada de haberos hecho caso en aquel entonces ☺.

AGRADECIMIENTOS

También he de agradecer mucho a la última incorporación a mis amistades en Barcelona. Gracias Jofre, por haberme exigido esos plazos cada dos días... por meterme caña para que terminara de escribir, entenderme y darme una vía de escape. Aryeta me ha ayudado un montón también. A ti y al zorrillo plateado os debo mucho.

Pero no sólo en Barcelona, en Madrid también dejé a mucha gente que durante este tiempo me ha estado enviando su apoyo, y esperando a que termine para celebrar mi regreso... aunque espero que eso tarde bastante tiempo todavía! Alex, Beto, Deiv, Cacho, Héctor, Mario, Ana, Laura... En Daimiel a Carlos y en Toledo a Irene! Gracias a todos por meterme caña cada vez que bajo (o subo según el nivel del mar) por aquellas tierras y apoyarme en la distancia, aunque a veces os diga que con amigos como vosotros no necesito enemigos! Pero ya se sabe, dicen que la confianza da asco. También a Javi Blanco, que estuvo en el 111 antes que yo pero al cual conocí en la complu; el mundo de la ciencia es un pañuelo. Javi, amigos como tú hay pocos, gracias por empujarme también a venir a Barcelona, hablarme tan bien de este grupo y hacer que tuviera tantas ganas de empezar mi nueva experiencia aquí. Todavía estoy esperando a que vuelvas a visitarme... menos mal que siempre nos quedará el Oishii.

En este grupo me falta alguien, pero no creo que haya pensado que me he olvidado de ella. Gema, Gemilla, mi sister... desde cuarto de carrera has sido mi primer apoyo, has estado conmigo en lo bueno y en lo malo (esto parece un matrimonio XD) y científicamente hablando hemos crecido juntas... tu allí y yo aquí. Gracias por cogerme el teléfono a horas intempestivas, por esas conversaciones de 2-3 horas, por soportar mis agobios y estreses, por enviarme energía en los momentos en los que hubiera mandado todo a la mierda y por ser tú, simplemente tú. Y paro, porque Mario se va a poner celoso!

No me puedo olvidar de Miguel Ángel Llamas... mi primer "jefe" y la primera persona que confió en mí laboralmente hablando, hoy en día aún menciono a Bionostra y todo lo que aprendí de ti, que no fue poco. Muchas gracias por haberme metido en el mundo de la ciencia, todo ha sido una cadena, si aquel día que aparecí en Tres Cantos no me hubieras escogido para aquellas prácticas, seguramente hoy no estaría aquí ☺.

También quiero agradecerle esta tesis a Quim, el eje LRP1/Pyk2 te lo sabes de memoria de tantas veces que me has escuchado practicar para congresos. Aunque no has llegado hasta el final de la tesis tengo que agradecerte el haber estado ahí al principio. Durante mucho tiempo has sido mi muleta para poder seguir adelante. Por ello, gracias.

AGRADECIMIENTOS

Y por último... la familia. Gracias a mis padres por recordarme todos los días lo que soy capaz de hacer cuando me lo propongo, por haberme enseñado a ser como soy, por haceros sentir tan cercanos aunque esteis a 600 km. Gracias por haberme ayudado y alentado a dar el salto. Pero también, gracias por las mudanzas express, los tuper de croquetas, los filetes al vacío y los paquetes de jamón serrano!!! Y porque sois los mejores y os quiero un montón. Gracias a mi hermana, Andrea, pequeña pero matona, que también me ha dado sus muestras de apoyo cuando lo he necesitado. A mi perra! Runa! Por los ladridos telefónicos y sus recibimientos cuando volvía a casa por vacaciones. A Friki y a Santi. Y a mi tía... Amalia, estés donde estés ahora mismo... gracias por enseñarme a ver todo con otra filosofía y por ayudarme a entender la vida; me hubiera gustado tanto que estuvieras aquí...

Muchas gracias a todos!

BIBLIOGRAFÍA

1. *Global status report on noncommunicable diseases 2010*, in *World Health Organization, Geneve*. 2011.
2. Mathers, C.D. and D. Loncar, *Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030*. PLoS Med, 2006. **3**(11): p. e442.
3. Umbría M, R.J., Aluja MP, Santos C, *Enfermedad Cardiovascular en España: Estudio epidemiológico descriptivo 1999-2010*. Antropo, 2014. **32**: p. 1-13.
4. Grundy, S.M., et al., *AHA/ACC scientific statement: Assessment of cardiovascular risk by use of multiple-risk-factor assessment equations: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association and the American College of Cardiology*. J Am Coll Cardiol, 1999. **34**(4): p. 1348-59.
5. Ross, R. and L. Harker, *Hyperlipidemia and atherosclerosis*. Science, 1976. **193**(4258): p. 1094-100.
6. Steinberg, D., *Thematic review series: the pathogenesis of atherosclerosis. An interpretive history of the cholesterol controversy, part V: the discovery of the statins and the end of the controversy*. J Lipid Res, 2006. **47**(7): p. 1339-51.
7. Steinberg, D., *The pathogenesis of atherosclerosis. An interpretive history of the cholesterol controversy, part IV: the 1984 coronary primary prevention trial ends it--almost*. J Lipid Res, 2006. **47**(1): p. 1-14.
8. Grundy, S.M., *Hypertriglyceridemia, atherogenic dyslipidemia, and the metabolic syndrome*. Am J Cardiol, 1998. **81**(4A): p. 18B-25B.
9. Lobos JM, C.A., *Factores de Riesgo Cardiovascular*. C&AP, 2006. **13**: p. 107-114.
10. Fuster, V., et al., *The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1)*. N Engl J Med, 1992. **326**(4): p. 242-50.
11. Ross, R., *Atherosclerosis--an inflammatory disease*. N Engl J Med, 1999. **340**(2): p. 115-26.
12. Lusis, A.J., *Atherosclerosis*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 233-41.
13. Rader, D.J. and A. Daugherty, *Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis*. Nature, 2008. **451**(7181): p. 904-13.
14. Fuster, V., et al., *The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (2)*. N Engl J Med, 1992. **326**(5): p. 310-8.
15. Iqbal, J. and M.M. Hussain, *Intestinal lipid absorption*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2009. **296**(6): p. E1183-94.
16. Schaffer, J.E., *Fatty acid transport: the roads taken*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2002. **282**(2): p. E239-46.
17. Su, X. and N.A. Abumrad, *Cellular fatty acid uptake: a pathway under construction*. Trends Endocrinol Metab, 2009. **20**(2): p. 72-7.
18. Stein, Y. and O. Stein, *Lipoprotein lipase and atherosclerosis*. Atherosclerosis, 2003. **170**(1): p. 1-9.
19. Dallinga-Thie, G.M., et al., *The metabolism of triglyceride-rich lipoproteins revisited: new players, new insight*. Atherosclerosis, 2010. **211**(1): p. 1-8.
20. Mamo, J.C.L., *Atherosclerosis as a post-prandial disease*. Endocrinol Metab., 1995. **2**: p. 229-244.

21. Lambert, M.S., et al., *The fatty acid composition of chylomicron remnants influences their binding and internalization by isolated hepatocytes*. Eur J Biochem, 2001. **268**(14): p. 3983-92.
22. Hoeg, J.M., et al., *Distinct hepatic receptors for low density lipoprotein and apolipoprotein E in humans*. Science, 1985. **227**(4688): p. 759-61.
23. Cooper, A.D., *Hepatic uptake of chylomicron remnants*. J Lipid Res, 1997. **38**(11): p. 2173-92.
24. **Beisiegel, U., W. Weber, G. Ihrke, J. Herz, and K. K. Stanley.**, *The LDL-receptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E-binding protein*. Nature. **341**: p. 162–164.
25. Rohlmann, A., et al., *Inducible inactivation of hepatic LRP gene by cre-mediated recombination confirms role of LRP in clearance of chylomicron remnants*. J Clin Invest, 1998. **101**(3): p. 689-95.
26. Zeng BJ, M.B., Martins IJ, Seydel U, Redgrave TG, *Chylomicron remnant uptake is regulated by the expression and function of heparan sulfate proteoglycan in hepatocytes*. J Lipid Res, 1998. **39**(4): p. 845-60.
27. Foley, E.M., et al., *Hepatic remnant lipoprotein clearance by heparan sulfate proteoglycans and low-density lipoprotein receptors depend on dietary conditions in mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2013. **33**(9): p. 2065-74.
28. Willnow, T.E., et al., *Low density lipoprotein receptor-related protein and gp330 bind similar ligands, including plasminogen activator-inhibitor complexes and lactoferrin, an inhibitor of chylomicron remnant clearance*. J Biol Chem, 1992. **267**(36): p. 26172-80.
29. Medh, J.D., et al., *Lipoprotein lipase- and hepatic triglyceride lipase-promoted very low density lipoprotein degradation proceeds via an apolipoprotein E-dependent mechanism*. J Lipid Res, 2000. **41**(11): p. 1858-71.
30. Karagiannides, I., et al., *Apolipoprotein E predisposes to obesity and related metabolic dysfunctions in mice*. FEBS J, 2008. **275**(19): p. 4796-809.
31. Lee, S.J., et al., *Chylomicron remnant uptake in the livers of mice expressing human apolipoproteins E3, E2 (Arg158-->Cys), and E3-Leiden*. J Lipid Res, 2004. **45**(12): p. 2199-210.
32. Phillips, M.C., *Apolipoprotein E isoforms and lipoprotein metabolism*. IUBMB Life, 2014. **66**(9): p. 616-23.
33. Gibbons, G.F., et al., *Synthesis and function of hepatic very-low-density lipoprotein*. Biochem Soc Trans, 2004. **32**(Pt 1): p. 59-64.
34. Molina, M.V.-C., CM.; Ruiz Gutierrez, V, *Metabolismo del colesterol, su regulación a nivel hepático e intestinal*. Grasas y aceites, International Journal of Fats and Oil, 1991. **42**(4): p. 298-308.
35. Williams, K.J., *Molecular processes that handle -- and mishandle -- dietary lipids*. J Clin Invest, 2008. **118**(10): p. 3247-59.
36. Goldstein, J.L. and M.S. Brown, *The LDL receptor*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009. **29**(4): p. 431-8.
37. Powell-Braxton, L., et al., *A mouse model of human familial hypercholesterolemia: markedly elevated low density lipoprotein cholesterol levels and severe atherosclerosis on a low-fat chow diet*. Nat Med, 1998. **4**(8): p. 934-8.
38. Alwaili, K., et al., *High-density lipoproteins and cardiovascular disease: 2010 update*. Expert Rev Cardiovasc Ther, 2010. **8**(3): p. 413-23.

39. Krause, B.R. and B.J. Auerbach, *Reverse cholesterol transport and future pharmacological approaches to the treatment of atherosclerosis*. *Curr Opin Investig Drugs*, 2001. **2**(3): p. 375-81.
40. Trigatti, B.L., *Hepatic high-density lipoprotein receptors: roles in lipoprotein metabolism and potential for therapeutic modulation*. *Curr Atheroscler Rep*, 2005. **7**(5): p. 344-50.
41. Rader, D.J., J. Cohen, and H.H. Hobbs, *Monogenic hypercholesterolemia: new insights in pathogenesis and treatment*. *J Clin Invest*, 2003. **111**(12): p. 1795-803.
42. Amemiya-Kudo, M., et al., *Transcriptional activities of nuclear SREBP-1a, -1c, and -2 to different target promoters of lipogenic and cholesterologenic genes*. *J Lipid Res*, 2002. **43**(8): p. 1220-35.
43. Goldstein, J.L., R.A. DeBose-Boyd, and M.S. Brown, *Protein sensors for membrane sterols*. *Cell*, 2006. **124**(1): p. 35-46.
44. Llorente-Cortes, V., et al., *Cholesteryl esters of aggregated LDL are internalized by selective uptake in human vascular smooth muscle cells*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. **26**(1): p. 117-23.
45. Llorente-Cortes, V., et al., *Sterol regulatory element-binding protein-2 negatively regulates low density lipoprotein receptor-related protein transcription*. *J Mol Biol*, 2006. **359**(4): p. 950-60.
46. Sato, R., *Sterol metabolism and SREBP activation*. *Arch Biochem Biophys*, 2010. **501**(2): p. 177-81.
47. Carson, S.D., *Plasma high density lipoproteins inhibit the activation of coagulation factor X by factor VIIa and tissue factor*. *FEBS Lett*, 1981. **132**(1): p. 37-40.
48. Rosenson, R.S. and G.D. Lowe, *Effects of lipids and lipoproteins on thrombosis and rheology*. *Atherosclerosis*, 1998. **140**(2): p. 271-80.
49. Grundy, S.M., *Atherogenic dyslipidemia associated with metabolic syndrome and insulin resistance*. *Clin Cornerstone*, 2006. **8 Suppl 1**: p. S21-7.
50. Mahley, R.W., K.H. Weisgraber, and Y. Huang, *Apolipoprotein E: structure determines function, from atherosclerosis to Alzheimer's disease to AIDS*. *J Lipid Res*, 2009. **50 Suppl**: p. S183-8.
51. Getz, G.S. and C.A. Reardon, *Apoprotein E as a lipid transport and signaling protein in the blood, liver, and artery wall*. *J Lipid Res*, 2009. **50 Suppl**: p. S156-61.
52. Plump, A.S., et al., *Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells*. *Cell*, 1992. **71**(2): p. 343-53.
53. Steinberg, D., *Lipoproteins and atherosclerosis. A look back and a look ahead*. *Arteriosclerosis*, 1983. **3**(4): p. 283-301.
54. Williams, K.J. and I. Tabas, *The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995. **15**(5): p. 551-61.
55. Hurt-Camejo, E., et al., *Cellular consequences of the association of apoB lipoproteins with proteoglycans. Potential contribution to atherogenesis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997. **17**(6): p. 1011-7.
56. Llorente-Cortes, V., M. Otero-Vinas, and L. Badimon, *Differential role of heparan sulfate proteoglycans on aggregated LDL uptake in human vascular smooth muscle cells and mouse embryonic fibroblasts*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002. **22**(11): p. 1905-11.

57. Tirziu, D., et al., *The effects of low density lipoproteins modified by incubation with chondroitin 6-sulfate on human aortic smooth muscle cells*. *Atherosclerosis*, 1999. **147**(1): p. 155-66.
58. Llorente-Cortes, V., et al., *Human coronary smooth muscle cells internalize versican-modified LDL through LDL receptor-related protein and LDL receptors*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002. **22**(3): p. 387-93.
59. Olsson, U., G. Ostergren-Lunden, and J. Moses, *Glycosaminoglycan-lipoprotein interaction*. *Glycoconj J*, 2001. **18**(10): p. 789-97.
60. Camejo, G., et al., *The extracellular matrix on atherogenesis and diabetes-associated vascular disease*. *Atheroscler Suppl*, 2002. **3**(1): p. 3-9.
61. Yamamoto, K., et al., *Secreted phospholipase A2, lipoprotein hydrolysis, and atherosclerosis: integration with lipidomics*. *Anal Bioanal Chem*, 2011. **400**(7): p. 1829-42.
62. Younis, N., et al., *Glycation of LDL in non-diabetic people: Small dense LDL is preferentially glycated both in vivo and in vitro*. *Atherosclerosis*, 2009. **202**(1): p. 162-8.
63. Napolitano, M., et al., *Effects of lycopene on the induction of foam cell formation by modified LDL*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007. **293**(6): p. E1820-7.
64. Hoppe, G., et al., *Non-conventional modification of low density lipoproteins: chemical models for macrophage recognition of oxidized LDL*. *Biochim Biophys Acta*, 1997. **1362**(2-3): p. 103-8.
65. Oorni, K., et al., *Aggregation, fusion, and vesicle formation of modified low density lipoprotein particles: molecular mechanisms and effects on matrix interactions*. *J Lipid Res*, 2000. **41**(11): p. 1703-14.
66. Oorni, K., et al., *Sphingomyelinase induces aggregation and fusion of small very low-density lipoprotein and intermediate-density lipoprotein particles and increases their retention to human arterial proteoglycans*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. **25**(8): p. 1678-83.
67. Graham, A., et al., *Human (THP-1) macrophages oxidize LDL by a thiol-dependent mechanism*. *Free Radic Res*, 1996. **25**(2): p. 181-92.
68. Itabe, H., *Oxidative modification of LDL: its pathological role in atherosclerosis*. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2009. **37**(1): p. 4-11.
69. Nicholls, S.J. and S.L. Hazen, *Myeloperoxidase and cardiovascular disease*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. **25**(6): p. 1102-11.
70. Basnakian, A.G., et al., *Carbamylated LDL*. *Adv Clin Chem*, 2010. **51**: p. 25-52.
71. Apostolov, E.O., et al., *Carbamylated-oxidized LDL: proatherosclerotic effects on endothelial cells and macrophages*. *J Atheroscler Thromb*, 2013. **20**(12): p. 878-92.
72. Benitez, S., et al., *Changes in low-density lipoprotein electronegativity and oxidizability after aerobic exercise are related to the increase in associated non-esterified fatty acids*. *Atherosclerosis*, 2002. **160**(1): p. 223-32.
73. Ito, T., Fujita, H., Tan, T., Ohte, N., *Malondialdehyde-modified low-density lipoprotein is a predictor of cardiac events in patients with stable angina on lipid-lowering therapy after percutaneous coronary intervention using drug-eluting stent*. *Atherosclerosis*, 2015. **239**(2): p. 311-317.
74. Ross, R. and J.A. Glomset, *The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts)*. *N Engl J Med*, 1976. **295**(7): p. 369-77.

75. Ross, R. and J.A. Glomset, *The pathogenesis of atherosclerosis (second of two parts)*. N Engl J Med, 1976. **295**(8): p. 420-5.
76. Libby, P., *Inflammation in atherosclerosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012. **32**(9): p. 2045-51.
77. Davignon, J. and P. Ganz, *Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis*. Circulation, 2004. **109**(23 Suppl 1): p. III27-32.
78. Rubbo, H., et al., *Interactions of nitric oxide and peroxynitrite with low-density lipoprotein*. Biol Chem, 2002. **383**(3-4): p. 547-52.
79. Steinberg, D. and J.L. Witztum, *Is the oxidative modification hypothesis relevant to human atherosclerosis? Do the antioxidant trials conducted to date refute the hypothesis?* Circulation, 2002. **105**(17): p. 2107-11.
80. Luscher, T.F. and M. Barton, *Biology of the endothelium*. Clin Cardiol, 1997. **20**(11 Suppl 2): p. II-3-10.
81. Galkina, E. and K. Ley, *Vascular adhesion molecules in atherosclerosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(11): p. 2292-301.
82. Davies, P.F., *Endothelial mechanisms of flow-mediated athero-protection and susceptibility*. Circ Res, 2007. **101**(1): p. 10-2.
83. Liao, L., et al., *Oxidized LDL-induced microvascular dysfunction. Dependence on oxidation procedure*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1995. **15**(12): p. 2305-11.
84. Libby, P., *Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes*. Circulation, 2001. **104**(3): p. 365-72.
85. Libby, P., P.M. Ridker, and A. Maseri, *Inflammation and atherosclerosis*. Circulation, 2002. **105**(9): p. 1135-43.
86. Tacke, F., et al., *Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques*. J Clin Invest, 2007. **117**(1): p. 185-94.
87. Chia, M.C., *The role of adhesion molecules in atherosclerosis*. Crit Rev Clin Lab Sci, 1998. **35**(6): p. 573-602.
88. Li, H., et al., *An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium*. Arterioscler Thromb, 1993. **13**(2): p. 197-204.
89. Gu, L., et al., *Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice*. Mol Cell, 1998. **2**(2): p. 275-81.
90. Boring, L., et al., *Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis*. Nature, 1998. **394**(6696): p. 894-7.
91. Mullick, A.E., P.S. Tobias, and L.K. Curtiss, *Modulation of atherosclerosis in mice by Toll-like receptor 2*. J Clin Invest, 2005. **115**(11): p. 3149-56.
92. Michelsen, K.S. and M. Arditi, *Toll-like receptor signaling and atherosclerosis*. Curr Opin Hematol, 2006. **13**(3): p. 163-8.
93. Millán, J., in *Medicina Cardiovascular*. 2005: Ed. Masson.
94. Kunjathoor, V.V., et al., *Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages*. J Biol Chem, 2002. **277**(51): p. 49982-8.
95. Febbraio, M., et al., *Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice*. J Clin Invest, 2000. **105**(8): p. 1049-56.

96. Suzuki, H., et al., *A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection*. Nature, 1997. **386**(6622): p. 292-6.
97. Frostegard, J., et al., *Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines*. Atherosclerosis, 1999. **145**(1): p. 33-43.
98. Caligiuri, G., et al., *Interleukin-10 deficiency increases atherosclerosis, thrombosis, and low-density lipoproteins in apolipoprotein E knockout mice*. Mol Med, 2003. **9**(1-2): p. 10-7.
99. Mallat, Z., et al., *Inhibition of transforming growth factor-beta signaling accelerates atherosclerosis and induces an unstable plaque phenotype in mice*. Circ Res, 2001. **89**(10): p. 930-4.
100. Doran, A.C., N. Meller, and C.A. McNamara, *Role of smooth muscle cells in the initiation and early progression of atherosclerosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(5): p. 812-9.
101. Newby, A.C., *Matrix metalloproteinase inhibition therapy for vascular diseases*. Vascul Pharmacol, 2012. **56**(5-6): p. 232-44.
102. Johnson, C. and Z.S. Galis, *Matrix metalloproteinase-2 and -9 differentially regulate smooth muscle cell migration and cell-mediated collagen organization*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(1): p. 54-60.
103. Cho, A. and M.A. Reidy, *Matrix metalloproteinase-9 is necessary for the regulation of smooth muscle cell replication and migration after arterial injury*. Circ Res, 2002. **91**(9): p. 845-51.
104. Llorente-Cortes, V., J. Martinez-Gonzalez, and L. Badimon, *Esterified cholesterol accumulation induced by aggregated LDL uptake in human vascular smooth muscle cells is reduced by HMG-CoA reductase inhibitors*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1998. **18**(5): p. 738-46.
105. Llorente-Cortes, V., et al., *Adipocyte differentiation-related protein is induced by LRP1-mediated aggregated LDL internalization in human vascular smooth muscle cells and macrophages*. J Lipid Res, 2007. **48**(10): p. 2133-40.
106. Llorente-Cortes, V., et al., *Sterol regulatory element binding proteins downregulate LDL receptor-related protein (LRP1) expression and LRP1-mediated aggregated LDL uptake by human macrophages*. Cardiovasc Res, 2007. **74**(3): p. 526-36.
107. Allahverdian, S., et al., *Contribution of intimal smooth muscle cells to cholesterol accumulation and macrophage-like cells in human atherosclerosis*. Circulation, 2014. **129**(15): p. 1551-9.
108. Schwartz, S.M., R. Virmani, and M.E. Rosenfeld, *The good smooth muscle cells in atherosclerosis*. Curr Atheroscler Rep, 2000. **2**(5): p. 422-9.
109. Otero-Vinas, M., et al., *Aggregated low density lipoproteins decrease metalloproteinase-9 expression and activity in human coronary smooth muscle cells*. Atherosclerosis, 2007. **194**(2): p. 326-33.
110. Choudhury, R.P., V. Fuster, and Z.A. Fayad, *Molecular, cellular and functional imaging of atherothrombosis*. Nat Rev Drug Discov, 2004. **3**(11): p. 913-25.
111. Naghavi, M., et al., *From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part I*. Circulation, 2003. **108**(14): p. 1664-72.

112. Dickson, B.C. and A.I. Gotlieb, *Towards understanding acute destabilization of vulnerable atherosclerotic plaques*. Cardiovasc Pathol, 2003. **12**(5): p. 237-48.
113. Virmani, R., et al., *Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(5): p. 1262-75.
114. Llorente-Cortes, V., et al., *Aggregated low-density lipoprotein uptake induces membrane tissue factor procoagulant activity and microparticle release in human vascular smooth muscle cells*. Circulation, 2004. **110**(4): p. 452-9.
115. Samouillan, V., et al., *Lipid loading of human vascular smooth muscle cells induces changes in tropoelastin protein levels and physical structure*. Biophys J, 2012. **103**(3): p. 532-40.
116. Prabhudas, M., et al., *Standardizing scavenger receptor nomenclature*. J Immunol, 2014. **192**(5): p. 1997-2006.
117. Goldstein, J.L.H., Y.K.; Basu, S.K.; Brown, M.S. , *Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition*. Proc Natl Acad Sci USA, 1979. **76**(1): p. 333-337.
118. Feng, H., et al., *Deficiency of scavenger receptor BI leads to impaired lymphocyte homeostasis and autoimmune disorders in mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011. **31**(11): p. 2543-51.
119. Acton, S., et al., *Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor*. Science, 1996. **271**(5248): p. 518-20.
120. Braun, A., et al., *Loss of SR-BI expression leads to the early onset of occlusive atherosclerotic coronary artery disease, spontaneous myocardial infarctions, severe cardiac dysfunction, and premature death in apolipoprotein E-deficient mice*. Circ Res, 2002. **90**(3): p. 270-6.
121. Mineo, C., et al., *High density lipoprotein-induced endothelial nitric-oxide synthase activation is mediated by Akt and MAP kinases*. J Biol Chem, 2003. **278**(11): p. 9142-9.
122. Saddar, S., C. Mineo, and P.W. Shaul, *Signaling by the high-affinity HDL receptor scavenger receptor B type I*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010. **30**(2): p. 144-50.
123. Endemann, G., et al., *CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein*. J Biol Chem, 1993. **268**(16): p. 11811-6.
124. Park, Y.M., *CD36, a scavenger receptor implicated in atherosclerosis*. Exp Mol Med, 2014. **46**: p. e99.
125. Febbraio, M., D.P. Hajjar, and R.L. Silverstein, *CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism*. J Clin Invest, 2001. **108**(6): p. 785-91.
126. Park, Y.M., M. Febbraio, and R.L. Silverstein, *CD36 modulates migration of mouse and human macrophages in response to oxidized LDL and may contribute to macrophage trapping in the arterial intima*. J Clin Invest, 2009. **119**(1): p. 136-45.
127. Go, G.W. and A. Mani, *Low-density lipoprotein receptor (LDLR) family orchestrates cholesterol homeostasis*. Yale J Biol Med, 2012. **85**(1): p. 19-28.
128. Goldstein, J.L. and M.S. Brown, *Binding and degradation of low density lipoproteins by cultured human fibroblasts. Comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia*. J Biol Chem, 1974. **249**(16): p. 5153-62.

129. Poirier, S., et al., *The proprotein convertase PCSK9 induces the degradation of low density lipoprotein receptor (LDLR) and its closest family members VLDLR and ApoER2*. J Biol Chem, 2008. **283**(4): p. 2363-72.
130. Kypreos, K.E. and V.I. Zannis, *LDL receptor deficiency or apoE mutations prevent remnant clearance and induce hypertriglyceridemia in mice*. J Lipid Res, 2006. **47**(3): p. 521-9.
131. Jones, C., et al., *Disruption of LDL but not VLDL clearance in autosomal recessive hypercholesterolemia*. J Clin Invest, 2007. **117**(1): p. 165-74.
132. Graham, M.J., et al., *Antisense inhibition of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 reduces serum LDL in hyperlipidemic mice*. J Lipid Res, 2007. **48**(4): p. 763-7.
133. Takahashi, S., et al., *The very low-density lipoprotein (VLDL) receptor: characterization and functions as a peripheral lipoprotein receptor*. J Atheroscler Thromb, 2004. **11**(4): p. 200-8.
134. Niemeier, A., et al., *VLDL receptor mediates the uptake of human chylomicron remnants in vitro*. J Lipid Res, 1996. **37**(8): p. 1733-42.
135. Wyne, K.L., et al., *Expression of the VLDL receptor in endothelial cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1996. **16**(3): p. 407-15.
136. Tacke, P.J., et al., *LDL receptor deficiency unmasks altered VLDL triglyceride metabolism in VLDL receptor transgenic and knockout mice*. J Lipid Res, 2000. **41**(12): p. 2055-62.
137. Qu, S., et al., *Role of VLDL receptor in the process of foam cell formation*. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2004. **24**(1): p. 1-4, 8.
138. Ishii, I., et al., *Intimal smooth muscle cells up-regulate beta-very low density lipoprotein-mediated cholesterol accumulation by enhancing beta-very low density lipoprotein uptake and decreasing cholesterol efflux*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1585**(1): p. 30-8.
139. Tacke, P.J., et al., *VLDL receptor deficiency enhances intimal thickening after vascular injury but does not affect atherosclerotic lesion area*. Atherosclerosis, 2002. **162**(1): p. 103-10.
140. Mulhaupt, H.A., et al., *Expression of very low density lipoprotein receptor in the vascular wall. Analysis of human tissues by in situ hybridization and immunohistochemistry*. Am J Pathol, 1996. **148**(6): p. 1985-97.
141. Lillis, A.P., et al., *LDL receptor-related protein 1: unique tissue-specific functions revealed by selective gene knockout studies*. Physiol Rev, 2008. **88**(3): p. 887-918.
142. Herz, J., et al., *Surface location and high affinity for calcium of a 500-kd liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor*. EMBO J, 1988. **7**(13): p. 4119-27.
143. Herz, J., et al., *Proteolytic processing of the 600 kd low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) occurs in a trans-Golgi compartment*. EMBO J, 1990. **9**(6): p. 1769-76.
144. Laatsch, A., et al., *Insulin stimulates hepatic low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) to increase postprandial lipoprotein clearance*. Atherosclerosis, 2009. **204**(1): p. 105-11.
145. May, P., *The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 in inflammation*. Curr Opin Lipidol, 2013. **24**(2): p. 134-7.
146. Gonias, S.L. and W.M. Campana, *LDL receptor-related protein-1: a regulator of inflammation in atherosclerosis, cancer, and injury to the nervous system*. Am J Pathol, 2014. **184**(1): p. 18-27.

147. Presicce, P., et al., *Human defensins activate monocyte-derived dendritic cells, promote the production of proinflammatory cytokines, and up-regulate the surface expression of CD91*. *J Leukoc Biol*, 2009. **86**(4): p. 941-8.
148. Fischer, N., et al., *Involvement of CD91 and scavenger receptors in Hsp70-facilitated activation of human antigen-specific CD4⁺ memory T cells*. *Eur J Immunol*, 2010. **40**(4): p. 986-97.
149. Costales, P., et al., *K Domain CR9 of Low Density Lipoprotein (LDL) Receptor-related Protein 1 (LRP1) Is Critical for Aggregated LDL-induced Foam Cell Formation from Human Vascular Smooth Muscle Cells*. *J Biol Chem*, 2015. **290**(24): p. 14852-65.
150. Llorente-Cortes, V., V. Barbarigo, and L. Badimon, *Low density lipoprotein receptor-related protein 1 modulates the proliferation and migration of human hepatic stellate cells*. *J Cell Physiol*, 2012. **227**(10): p. 3528-33.
151. Martiskainen, H., et al., *Targeting ApoE4/ApoE receptor LRP1 in Alzheimer's disease*. *Expert Opin Ther Targets*, 2013. **17**(7): p. 781-94.
152. Kanekiyo, T., et al., *LRP1 in brain vascular smooth muscle cells mediates local clearance of Alzheimer's amyloid-beta*. *J Neurosci*, 2012. **32**(46): p. 16458-65.
153. Llorente-Cortes, V., J. Martinez-Gonzalez, and L. Badimon, *LDL receptor-related protein mediates uptake of aggregated LDL in human vascular smooth muscle cells*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000. **20**(6): p. 1572-9.
154. Nasarre, L., et al., *Low density lipoprotein receptor-related protein 1 is upregulated in epicardial fat from type 2 diabetes mellitus patients and correlates with glucose and triglyceride plasma levels*. *Acta Diabetol*, 2014. **51**(1): p. 23-30.
155. Liu, C.C., et al., *Neuronal LRP1 regulates glucose metabolism and insulin signaling in the brain*. *J Neurosci*, 2015. **35**(14): p. 5851-9.
156. Boucher, P., et al., *LRP: role in vascular wall integrity and protection from atherosclerosis*. *Science*, 2003. **300**(5617): p. 329-32.
157. Boucher, P. and J. Herz, *Signaling through LRP1: Protection from atherosclerosis and beyond*. *Biochem Pharmacol*, 2011. **81**(1): p. 1-5.
158. Overton, C.D., et al., *Deletion of macrophage LDL receptor-related protein increases atherogenesis in the mouse*. *Circ Res*, 2007. **100**(5): p. 670-7.
159. Llorente-Cortes, V., et al., *Intracellular lipid accumulation, low-density lipoprotein receptor-related protein expression, and cell survival in vascular smooth muscle cells derived from normal and atherosclerotic human coronaries*. *Eur J Clin Invest*, 2004. **34**(3): p. 182-90.
160. Llorente-Cortes, V., et al., *Low-density lipoprotein upregulates low-density lipoprotein receptor-related protein expression in vascular smooth muscle cells: possible involvement of sterol regulatory element binding protein-2-dependent mechanism*. *Circulation*, 2002. **106**(24): p. 3104-10.
161. Sendra, J., et al., *Angiotensin II upregulates LDL receptor-related protein (LRP1) expression in the vascular wall: a new pro-atherogenic mechanism of hypertension*. *Cardiovasc Res*, 2008. **78**(3): p. 581-9.
162. Castellano, J., et al., *Hypoxia stimulates low-density lipoprotein receptor-related protein-1 expression through hypoxia-inducible factor-1alpha in human vascular smooth muscle cells*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011. **31**(6): p. 1411-20.

163. Cal, R., et al., *Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 mediates hypoxia-induced very low density lipoprotein-cholesteryl ester uptake and accumulation in cardiomyocytes*. Cardiovasc Res, 2012. **94**(3): p. 469-79.
164. Hiltunen, T.P., et al., *Expression of LDL receptor, VLDL receptor, LDL receptor-related protein, and scavenger receptor in rabbit atherosclerotic lesions: marked induction of scavenger receptor and VLDL receptor expression during lesion development*. Circulation, 1998. **97**(11): p. 1079-86.
165. Luoma, J., et al., *Expression of alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein and scavenger receptor in human atherosclerotic lesions*. J Clin Invest, 1994. **93**(5): p. 2014-21.
166. Moestrup, S.K., J. Gliemann, and G. Pallesen, *Distribution of the alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein in human tissues*. Cell Tissue Res, 1992. **269**(3): p. 375-82.
167. Costales, P., et al., *Selective role of sterol regulatory element binding protein isoforms in aggregated LDL-induced vascular low density lipoprotein receptor-related protein-1 expression*. Atherosclerosis, 2010. **213**(2): p. 458-68.
168. Llorente-Cortes, V. and L. Badimon, *LDL receptor-related protein and the vascular wall: implications for atherothrombosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(3): p. 497-504.
169. Camino-Lopez, S., et al., *Tissue factor induction by aggregated LDL depends on LDL receptor-related protein expression (LRP1) and Rho A translocation in human vascular smooth muscle cells*. Cardiovasc Res, 2007. **73**(1): p. 208-16.
170. Camino-Lopez, S., et al., *Aggregated low density lipoprotein induces tissue factor by inhibiting sphingomyelinase activity in human vascular smooth muscle cells*. J Thromb Haemost, 2009. **7**(12): p. 2137-46.
171. Garcia-Dorado, D., et al., *Calcium-mediated cell death during myocardial reperfusion*. Cardiovasc Res, 2012. **94**(2): p. 168-80.
172. Clunn, G.F., P.S. Sever, and A.D. Hughes, *Calcium channel regulation in vascular smooth muscle cells: synergistic effects of statins and calcium channel blockers*. Int J Cardiol, 2010. **139**(1): p. 2-6.
173. Cribbs, L.L., *T-type Ca²⁺ channels in vascular smooth muscle: multiple functions*. Cell Calcium, 2006. **40**(2): p. 221-30.
174. Orchard, C. and F. Brette, *t-Tubules and sarcoplasmic reticulum function in cardiac ventricular myocytes*. Cardiovasc Res, 2008. **77**(2): p. 237-44.
175. Grantham, C.J. and M.B. Cannell, *Ca²⁺ influx during the cardiac action potential in guinea pig ventricular myocytes*. Circ Res, 1996. **79**(2): p. 194-200.
176. Bers, D.M., *Cardiac excitation-contraction coupling*. Nature, 2002. **415**(6868): p. 198-205.
177. Mundiña-Weilenmann, C., ; Vittone, L.; Said, M.; Mattiazzi, A.,; *Phospholamban: una pequeña proteína que regula la contractilidad miocárdica* Rev Fed Arg Cardiol, 2001. **30**: p. 651-658.
178. Eisner, D., et al., *Calcium flux balance in the heart*. J Mol Cell Cardiol, 2013. **58**: p. 110-7.
179. Hasenfuss, G. and B. Pieske, *Calcium cycling in congestive heart failure*. J Mol Cell Cardiol, 2002. **34**(8): p. 951-69.

180. del Monte, F., et al., *Restoration of contractile function in isolated cardiomyocytes from failing human hearts by gene transfer of SERCA2a*. *Circulation*, 1999. **100**(23): p. 2308-11.
181. French, J.P., et al., *Ischemia-reperfusion-induced calpain activation and SERCA2a degradation are attenuated by exercise training and calpain inhibition*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006. **290**(1): p. H128-36.
182. Nef, H.M., et al., *Reduced sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase activity and dephosphorylated phospholamban contribute to contractile dysfunction in human hibernating myocardium*. *Mol Cell Biochem*, 2006. **282**(1-2): p. 53-63.
183. Byrne, M.J., et al., *Recirculating cardiac delivery of AAV2/1SERCA2a improves myocardial function in an experimental model of heart failure in large animals*. *Gene Ther*, 2008. **15**(23): p. 1550-7.
184. Kawase, Y., et al., *Reversal of cardiac dysfunction after long-term expression of SERCA2a by gene transfer in a pre-clinical model of heart failure*. *J Am Coll Cardiol*, 2008. **51**(11): p. 1112-9.
185. Prunier, F., et al., *Prevention of ventricular arrhythmias with sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase pump overexpression in a porcine model of ischemia reperfusion*. *Circulation*, 2008. **118**(6): p. 614-24.
186. Brittsan, A.G., et al., *Maximal inhibition of SERCA2 Ca(2+) affinity by phospholamban in transgenic hearts overexpressing a non-phosphorylatable form of phospholamban*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(16): p. 12129-35.
187. Lang, D., et al., *Role of Pyk2 in cardiac arrhythmogenesis*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011. **301**(3): p. H975-83.
188. Heidkamp, M.C., et al., *PYK2 regulates SERCA2 gene expression in neonatal rat ventricular myocytes*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2005. **289**(2): p. C471-82.
189. Lopaschuk, G.D., *Treating ischemic heart disease by pharmacologically improving cardiac energy metabolism*. *Am J Cardiol*, 1998. **82**(5A): p. 14K-17K.
190. Nozaki, S., et al., *CD36 mediates long-chain fatty acid transport in human myocardium: complete myocardial accumulation defect of radiolabeled long-chain fatty acid analog in subjects with CD36 deficiency*. *Mol Cell Biochem*, 1999. **192**(1-2): p. 129-35.
191. Watanabe, K., et al., *Myocardial CD36 expression and fatty acid accumulation in patients with type I and II CD36 deficiency*. *Ann Nucl Med*, 1998. **12**(5): p. 261-6.
192. Goldberg, I.J., R.H. Eckel, and N.A. Abumrad, *Regulation of fatty acid uptake into tissues: lipoprotein lipase- and CD36-mediated pathways*. *J Lipid Res*, 2009. **50 Suppl**: p. S86-90.
193. Bharadwaj, K.G., et al., *Chylomicron- and VLDL-derived lipids enter the heart through different pathways: in vivo evidence for receptor- and non-receptor-mediated fatty acid uptake*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(49): p. 37976-86.
194. Niu, Y.G., D. Hauton, and R.D. Evans, *Utilization of triacylglycerol-rich lipoproteins by the working rat heart: routes of uptake and metabolic fates*. *J Physiol*, 2004. **558**(Pt 1): p. 225-37.
195. Fielding, C.J., *Metabolism of cholesterol-rich chylomicrons. Mechanism of binding and uptake of cholesteryl esters by the vascular bed of the perfused rat heart*. *J Clin Invest*, 1978. **62**(1): p. 141-51.

196. Merkel, M., et al., *Catalytically inactive lipoprotein lipase expression in muscle of transgenic mice increases very low density lipoprotein uptake: direct evidence that lipoprotein lipase bridging occurs in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(23): p. 13841-6.
197. Nakano, D., et al., *Chronic hypoxia accelerates the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice*. Hypertens Res, 2005. **28**(10): p. 837-45.
198. Oorni, K. and P.T. Kovanen, *Enhanced extracellular lipid accumulation in acidic environments*. Curr Opin Lipidol, 2006. **17**(5): p. 534-40.
199. Simon, M.C. and B. Keith, *The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(4): p. 285-96.
200. Ruas, J.L., U. Lendahl, and L. Poellinger, *Modulation of vascular gene expression by hypoxia*. Curr Opin Lipidol, 2007. **18**(5): p. 508-14.
201. Carmeliet, P., *Basic Concepts of (Myocardial) Angiogenesis: Role of Vascular Endothelial Growth Factor and Angiopoietin*. Curr Interv Cardiol Rep, 1999. **1**(4): p. 322-335.
202. Perman, J.C., et al., *The VLDL receptor promotes lipotoxicity and increases mortality in mice following an acute myocardial infarction*. J Clin Invest, 2011. **121**(7): p. 2625-40.
203. Lisy, K. and D.J. Peet, *Turn me on: regulating HIF transcriptional activity*. Cell Death Differ, 2008. **15**(4): p. 642-9.
204. Ambrosini, G., et al., *Transcriptional activation of the human leptin gene in response to hypoxia. Involvement of hypoxia-inducible factor 1*. J Biol Chem, 2002. **277**(37): p. 34601-9.
205. Morillas Blasco, P.J.H.M., A.; Pallarés Carratalá, V.; Portolés Sanz, M.; Cosín Aguilar, J., *Tratamiento metabólico de la cardiopatía isquémica*. Rev Clin Esp, 2004. **204**(2): p. 109-118.
206. Leppanen, O., et al., *ATP depletion in macrophages in the core of advanced rabbit atherosclerotic plaques in vivo*. Atherosclerosis, 2006. **188**(2): p. 323-30.
207. Chen, Q., et al., *Matrix metalloproteinases: inflammatory regulators of cell behaviors in vascular formation and remodeling*. Mediators Inflamm, 2013. **2013**: p. 928315.
208. Raffetto, J.D. and R.A. Khalil, *Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease*. Biochem Pharmacol, 2008. **75**(2): p. 346-59.
209. Siefert, S.A. and R. Sarkar, *Matrix metalloproteinases in vascular physiology and disease*. Vascular, 2012. **20**(4): p. 210-6.
210. Gough, P.J., et al., *Macrophage expression of active MMP-9 induces acute plaque disruption in apoE-deficient mice*. J Clin Invest, 2006. **116**(1): p. 59-69.
211. Falk, E., P.K. Shah, and V. Fuster, *Coronary plaque disruption*. Circulation, 1995. **92**(3): p. 657-71.
212. Gross, J. and C.M. Lapiere, *Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1962. **48**: p. 1014-22.
213. Visse, R. and H. Nagase, *Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry*. Circ Res, 2003. **92**(8): p. 827-39.

214. Nagase, H., R. Visse, and G. Murphy, *Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs*. Cardiovasc Res, 2006. **69**(3): p. 562-73.
215. Newby, A.C., *Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture*. Physiol Rev, 2005. **85**(1): p. 1-31.
216. Chesler, N.C., D.N. Ku, and Z.S. Galis, *Transmural pressure induces matrix-degrading activity in porcine arteries ex vivo*. Am J Physiol, 1999. **277**(5 Pt 2): p. H2002-9.
217. Grote, K., et al., *Mechanical stretch enhances mRNA expression and proenzyme release of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) via NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species*. Circ Res, 2003. **92**(11): p. e80-6.
218. Li, H., et al., *FoxO4 regulates tumor necrosis factor alpha-directed smooth muscle cell migration by activating matrix metalloproteinase 9 gene transcription*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(7): p. 2676-86.
219. Ben-Yosef, Y., et al., *Hypoxia of endothelial cells leads to MMP-2-dependent survival and death*. Am J Physiol Cell Physiol, 2005. **289**(5): p. C1321-31.
220. Kuzuya, M., et al., *Effect of MMP-2 deficiency on atherosclerotic lesion formation in apoE-deficient mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(5): p. 1120-5.
221. Johnson, J.L., et al., *Divergent effects of matrix metalloproteinases 3, 7, 9, and 12 on atherosclerotic plaque stability in mouse brachiocephalic arteries*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(43): p. 15575-80.
222. Newby, A.C., *Metalloproteinases and vulnerable atherosclerotic plaques*. Trends Cardiovasc Med, 2007. **17**(8): p. 253-8.
223. Newby, A.C., *Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates*. Cardiovasc Res, 2006. **69**(3): p. 614-24.
224. Hulten, L.M. and M. Levin, *The role of hypoxia in atherosclerosis*. Curr Opin Lipidol, 2009. **20**(5): p. 409-14.
225. Ribatti, D., F. Levi-Schaffer, and P.T. Kovanen, *Inflammatory angiogenesis in atherogenesis--a double-edged sword*. Ann Med, 2008. **40**(8): p. 606-21.
226. Jiang, G., et al., *RNA interference for HIF-1alpha inhibits foam cells formation in vitro*. Eur J Pharmacol, 2007. **562**(3): p. 183-90.
227. Fu, H., et al., *Hypoxia stimulates the expression of macrophage migration inhibitory factor in human vascular smooth muscle cells via HIF-1alpha dependent pathway*. BMC Cell Biol, 2010. **11**: p. 66.
228. Avraham, H., et al., *RAFTK/Pyk2-mediated cellular signalling*. Cell Signal, 2000. **12**(3): p. 123-33.
229. Beitner-Johnson, D., et al., *Calcium-dependent activation of Pyk2 by hypoxia*. Cell Signal, 2002. **14**(2): p. 133-7.
230. Xu, C.S., et al., *Involvement of ROS-alpha v beta 3 integrin-FAK/Pyk2 in the inhibitory effect of melatonin on U251 glioma cell migration and invasion under hypoxia*. J Transl Med, 2015. **13**: p. 95.
231. Perez, J., et al., *PYK2 signaling is required for PDGF-dependent vascular smooth muscle cell proliferation*. Am J Physiol Cell Physiol, 2011. **301**(1): p. C242-51.
232. Fukai, K., et al., *Pyk2 aggravates hypoxia-induced pulmonary hypertension by activating HIF-1alpha*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2015. **308**(8): p. H951-9.

233. Koppel, A.C., et al., *Delayed skin wound repair in proline-rich protein tyrosine kinase 2 knockout mice*. Am J Physiol Cell Physiol, 2014. **306**(10): p. C899-909.
234. Sun, C.K., et al., *Proline-rich tyrosine kinase 2 (Pyk2) promotes cell motility of hepatocellular carcinoma through induction of epithelial to mesenchymal transition*. PLoS One, 2011. **6**(4): p. e18878.
235. Yang, C.M., et al., *NADPH oxidase/ROS-dependent PYK2 activation is involved in TNF-alpha-induced matrix metalloproteinase-9 expression in rat heart-derived H9c2 cells*. Toxicol Appl Pharmacol, 2013. **272**(2): p. 431-42.
236. Song, H., et al., *Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 promotes cancer cell migration and invasion by inducing the expression of matrix metalloproteinases 2 and 9*. Cancer Res, 2009. **69**(3): p. 879-86.
237. Mantuano, E., et al., *The hemopexin domain of matrix metalloproteinase-9 activates cell signaling and promotes migration of schwann cells by binding to low-density lipoprotein receptor-related protein*. J Neurosci, 2008. **28**(45): p. 11571-82.
238. Jung, H.O., et al., *Angiotensin II-induced smooth muscle cell migration is mediated by LDL receptor-related protein 1 via regulation of matrix metalloproteinase 2 expression*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **402**(4): p. 577-82.
239. Okamoto, R., et al., *The effect of oxygen on the development of atherosclerosis in WHHL rabbits*. Atherosclerosis, 1983. **47**(1): p. 47-53.
240. Wada, Y., et al., *Lipid accumulation in smooth muscle cells under LDL loading is independent of LDL receptor pathway and enhanced by hypoxic conditions*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. **22**(10): p. 1712-9.
241. McKay, R.G., et al., *Left ventricular remodeling after myocardial infarction: a corollary to infarct expansion*. Circulation, 1986. **74**(4): p. 693-702.
242. Fulop, T., A. Khalil, and A. Larbi, *The role of elastin peptides in modulating the immune response in aging and age-related diseases*. Pathol Biol (Paris), 2012. **60**(1): p. 28-33.
243. Augier, T., et al., *Medial elastic structure alterations in atherosclerotic arteries in minipigs: plaque proximity and arterial site specificity*. Matrix Biol, 1997. **15**(7): p. 455-67.
244. O'Rourke, M.F., *Arterial aging: pathophysiological principles*. Vasc Med, 2007. **12**(4): p. 329-41.
245. Mecham, R.P., *Introduction: catalyzing matrix stability*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1991. **5**(3): p. 205.
246. Van der Donckt, C., et al., *Elastin fragmentation in atherosclerotic mice leads to intraplaque neovascularization, plaque rupture, myocardial infarction, stroke, and sudden death*. Eur Heart J, 2015. **36**(17): p. 1049-58.
247. Fonovic, M. and B. Turk, *Cysteine cathepsins and extracellular matrix degradation*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1840**(8): p. 2560-70.
248. Turk, V., et al., *Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1824**(1): p. 68-88.
249. Bromme, D., F.S. Nallaseth, and B. Turk, *Production and activation of recombinant papain-like cysteine proteases*. Methods, 2004. **32**(2): p. 199-206.
250. Qin, Y. and G.P. Shi, *Cysteinyll cathepsins and mast cell proteases in the pathogenesis and therapeutics of cardiovascular diseases*. Pharmacol Ther, 2011. **131**(3): p. 338-50.

251. Ge, J., et al., *Enhanced myocardial cathepsin B expression in patients with dilated cardiomyopathy*. Eur J Heart Fail, 2006. **8**(3): p. 284-9.
252. Sun, M., et al., *Cathepsin-L contributes to cardiac repair and remodelling post-infarction*. Cardiovasc Res, 2011. **89**(2): p. 374-83.
253. Cheng, X.W., et al., *Elastolytic cathepsin induction/activation system exists in myocardium and is upregulated in hypertensive heart failure*. Hypertension, 2006. **48**(5): p. 979-87.
254. Chapman, H.A., R.J. Riese, and G.P. Shi, *Emerging roles for cysteine proteases in human biology*. Annu Rev Physiol, 1997. **59**: p. 63-88.
255. Panwar, P., et al., *Effects of cysteine proteases on the structural and mechanical properties of collagen fibers*. J Biol Chem, 2013. **288**(8): p. 5940-50.
256. Novinec, M., et al., *Interaction between human cathepsins K, L, and S and elastins: mechanism of elastinolysis and inhibition by macromolecular inhibitors*. J Biol Chem, 2007. **282**(11): p. 7893-902.
257. Cailhier, J.F., et al., *Caspase-3 activation triggers extracellular cathepsin L release and endorepellin proteolysis*. J Biol Chem, 2008. **283**(40): p. 27220-9.
258. Giacca, A., et al., *Lipid-induced pancreatic beta-cell dysfunction: focus on in vivo studies*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2011. **300**(2): p. E255-62.
259. Zhou, Y.T., et al., *Lipotoxic heart disease in obese rats: implications for human obesity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(4): p. 1784-9.
260. Christoffersen, C., et al., *Cardiac lipid accumulation associated with diastolic dysfunction in obese mice*. Endocrinology, 2003. **144**(8): p. 3483-90.
261. Goldberg, I.J., C.M. Trent, and P.C. Schulze, *Lipid metabolism and toxicity in the heart*. Cell Metab, 2012. **15**(6): p. 805-12.
262. Iozzo, P., et al., *Contribution of glucose tolerance and gender to cardiac adiposity*. J Clin Endocrinol Metab, 2009. **94**(11): p. 4472-82.
263. McGavock, J.M., et al., *Adiposity of the heart, revisited*. Ann Intern Med, 2006. **144**(7): p. 517-24.
264. Jodalen, H., et al., *Lipid accumulation in the myocardium during acute regional ischaemia in cats*. J Mol Cell Cardiol, 1985. **17**(10): p. 973-80.
265. Fang, K.M., et al., *Free fatty acids act as endogenous ionophores, resulting in Na⁺ and Ca²⁺ influx and myocyte apoptosis*. Cardiovasc Res, 2008. **78**(3): p. 533-45.
266. Buchanan, J., et al., *Reduced cardiac efficiency and altered substrate metabolism precedes the onset of hyperglycemia and contractile dysfunction in two mouse models of insulin resistance and obesity*. Endocrinology, 2005. **146**(12): p. 5341-9.
267. Borradaile, N.M., et al., *Disruption of endoplasmic reticulum structure and integrity in lipotoxic cell death*. J Lipid Res, 2006. **47**(12): p. 2726-37.
268. Wende, A.R. and E.D. Abel, *Lipotoxicity in the heart*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1801**(3): p. 311-9.
269. Basu, R., et al., *Type 1 diabetic cardiomyopathy in the Akita (Ins2WT/C96Y) mouse model is characterized by lipotoxicity and diastolic dysfunction with preserved systolic function*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009. **297**(6): p. H2096-108.
270. Hasenfuss, G., *Alterations of calcium-regulatory proteins in heart failure*. Cardiovasc Res, 1998. **37**(2): p. 279-89.

271. Huang, Y., et al., *Cardiac systolic and diastolic dysfunction after a cholesterol-rich diet*. *Circulation*, 2004. **109**(1): p. 97-102.
272. Luo, T.Y., et al., *Effect of hypercholesterolemia on myocardial function in New Zealand white rabbits*. *J Biomed Sci*, 2004. **11**(6): p. 829-37.
273. Hool, L.C., *Hypoxia increases the sensitivity of the L-type Ca(2+) current to beta-adrenergic receptor stimulation via a C2 region-containing protein kinase C isoform*. *Circ Res*, 2000. **87**(12): p. 1164-71.
274. Oka, T. and I. Komuro, *Molecular mechanisms underlying the transition of cardiac hypertrophy to heart failure*. *Circ J*, 2008. **72 Suppl A**: p. A13-6.
275. Seta, K.A., et al., *The role of calcium in hypoxia-induced signal transduction and gene expression*. *Cell Calcium*, 2004. **36**(3-4): p. 331-40.
276. Motloch, L.J., J. Hu, and F.G. Akar, *The mitochondrial translocator protein and arrhythmogenesis in ischemic heart disease*. *Oxid Med Cell Longev*, 2015. **2015**: p. 234104.
277. Kuo, C.Y., et al., *Mitochondrial Lon protease controls ROS-dependent apoptosis in cardiomyocyte under hypoxia*. *Mitochondrion*, 2015. **23**: p. 7-16.
278. Chen, S.J., M.E. Bradley, and T.C. Lee, *Chemical hypoxia triggers apoptosis of cultured neonatal rat cardiac myocytes: modulation by calcium-regulated proteases and protein kinases*. *Mol Cell Biochem*, 1998. **178**(1-2): p. 141-9.
279. Gwathmey, J.K., et al., *Abnormal intracellular calcium handling in myocardium from patients with end-stage heart failure*. *Circ Res*, 1987. **61**(1): p. 70-6.
280. Lounsbury, K.M., Q. Hu, and R.C. Ziegelstein, *Calcium signaling and oxidant stress in the vasculature*. *Free Radic Biol Med*, 2000. **28**(9): p. 1362-9.
281. Ronkainen, V.P., R. Skoumal, and P. Tavi, *Hypoxia and HIF-1 suppress SERCA2a expression in embryonic cardiac myocytes through two interdependent hypoxia response elements*. *J Mol Cell Cardiol*, 2011. **50**(6): p. 1008-16.
282. Silter, M., et al., *Impaired Ca(2+)-handling in HIF-1alpha(+/-) mice as a consequence of pressure overload*. *Pflugers Arch*, 2010. **459**(4): p. 569-77.
283. Chen, H., et al., *Cathepsin S-mediated fibroblast trans-differentiation contributes to left ventricular remodelling after myocardial infarction*. *Cardiovasc Res*, 2013. **100**(1): p. 84-94.
284. Jugdutt, B.I., *Ventricular remodeling after infarction and the extracellular collagen matrix: when is enough enough?* *Circulation*, 2003. **108**(11): p. 1395-403.
285. See, F., et al., *Fibrosis as a therapeutic target post-myocardial infarction*. *Curr Pharm Des*, 2005. **11**(4): p. 477-87.
286. Sun, Y., et al., *Cardiac remodeling by fibrous tissue after infarction in rats*. *J Lab Clin Med*, 2000. **135**(4): p. 316-23.
287. Takahashi, S., A.C. Barry, and S.M. Factor, *Collagen degradation in ischaemic rat hearts*. *Biochem J*, 1990. **265**(1): p. 233-41.
288. Matsumura, S., et al., *Targeted deletion or pharmacological inhibition of MMP-2 prevents cardiac rupture after myocardial infarction in mice*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(3): p. 599-609.
289. Hayashidani, S., et al., *Targeted deletion of MMP-2 attenuates early LV rupture and late remodeling after experimental myocardial infarction*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003. **285**(3): p. H1229-35.

290. Goldfarb, J.W., M. Roth, and J. Han, *Myocardial fat deposition after left ventricular myocardial infarction: assessment by using MR water-fat separation imaging*. Radiology, 2009. **253**(1): p. 65-73.
291. Pulinilkunnil, T., et al., *Ischemia-reperfusion alters cardiac lipoprotein lipase*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1801**(2): p. 171-5.
292. Mwaikambo, B.R., et al., *Hypoxia up-regulates CD36 expression and function via hypoxia-inducible factor-1- and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanisms*. J Biol Chem, 2009. **284**(39): p. 26695-707.
293. Listenberger, L.L., et al., *Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(6): p. 3077-82.
294. Barba, I., et al., *Effect of intracellular lipid droplets on cytosolic Ca²⁺ and cell death during ischaemia-reperfusion injury in cardiomyocytes*. J Physiol, 2009. **587**(Pt 6): p. 1331-41.
295. Cal, R., et al., *Low density lipoprotein receptor-related protein 1 expression correlates with cholesteryl ester accumulation in the myocardium of ischemic cardiomyopathy patients*. J Transl Med, 2012. **10**: p. 160.
296. Montel, V., et al., *The low-density lipoprotein receptor-related protein regulates cancer cell survival and metastasis development*. Cancer Res, 2007. **67**(20): p. 9817-24.
297. Hahn-Dantona, E., et al., *The low density lipoprotein receptor-related protein modulates levels of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) by mediating its cellular catabolism*. J Biol Chem, 2001. **276**(18): p. 15498-503.
298. Revuelta-Lopez, E., et al., *Hypoxia induces metalloproteinase-9 activation and human vascular smooth muscle cell migration through low-density lipoprotein receptor-related protein 1-mediated Pyk2 phosphorylation*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2013. **33**(12): p. 2877-87.
299. Varela, O., J. Martinez-Gonzalez, and L. Badimon, *The response of smooth muscle cells to alpha-thrombin depends on its arterial origin: comparison among different species*. Eur J Clin Invest, 1998. **28**(4): p. 313-23.
300. Churchman, A.T. and R.C. Siow, *Isolation, culture and characterisation of vascular smooth muscle cells*. Methods Mol Biol, 2009. **467**: p. 127-38.
301. Claycomb, W.C., et al., *HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(6): p. 2979-84.
302. Havel, R.J., H.A. Eder, and J.H. Bragdon, *The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum*. J Clin Invest, 1955. **34**(9): p. 1345-53.
303. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biol Chem, 1951. **193**(1): p. 265-75.
304. Allain, C.C., et al., *Enzymatic determination of total serum cholesterol*. Clin Chem, 1974. **20**(4): p. 470-5.
305. Guyton, J.R., K.F. Klemp, and M.P. Mims, *Altered ultrastructural morphology of self-aggregated low density lipoproteins: coalescence of lipid domains forming droplets and vesicles*. J Lipid Res, 1991. **32**(6): p. 953-62.
306. Bligh, E.G. and W.J. Dyer, *A rapid method of total lipid extraction and purification*. Can J Biochem Physiol, 1959. **37**(8): p. 911-7.
307. Padro, T., et al., *Low-density lipoproteins impair migration of human coronary vascular smooth muscle cells and induce changes in the proteomic profile of myosin light chain*. Cardiovasc Res, 2008. **77**(1): p. 211-20.

308. Sabri, A., et al., *Calcium- and protein kinase C-dependent activation of the tyrosine kinase PYK2 by angiotensin II in vascular smooth muscle*. *Circ Res*, 1998. **83**(8): p. 841-51.
309. Eguchi, S., et al., *Involvement of PYK2 in angiotensin II signaling of vascular smooth muscle cells*. *Hypertension*, 1999. **33**(1 Pt 2): p. 201-6.
310. Liu, Y.V., et al., *Calcineurin promotes hypoxia-inducible factor 1alpha expression by dephosphorylating RACK1 and blocking RACK1 dimerization*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(51): p. 37064-73.
311. Zhu, W.H., et al., *Membrane depolarization in PC-12 cells during hypoxia is regulated by an O₂-sensitive K⁺ current*. *Am J Physiol*, 1996. **271**(2 Pt 1): p. C658-65.
312. Schaller, M.D., *Cellular functions of FAK kinases: insight into molecular mechanisms and novel functions*. *J Cell Sci*, 2010. **123**(Pt 7): p. 1007-13.
313. Bentzon, J.F. and E. Falk, *Atherosclerotic lesions in mouse and man: is it the same disease?* *Curr Opin Lipidol*, 2010. **21**(5): p. 434-40.
314. Allahverdian, S., P.S. Pannu, and G.A. Francis, *Contribution of monocyte-derived macrophages and smooth muscle cells to arterial foam cell formation*. *Cardiovasc Res*, 2012. **95**(2): p. 165-72.
315. Nakashima, Y., et al., *Early human atherosclerosis: accumulation of lipid and proteoglycans in intimal thickenings followed by macrophage infiltration*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007. **27**(5): p. 1159-65.
316. Andersen, O.M., et al., *Ca²⁺ binding to complement-type repeat domains 5 and 6 from the low-density lipoprotein receptor-related protein*. *BMC Biochem*, 2003. **4**: p. 7.
317. Martel-Gallegos, G., et al., *Oxidative stress induced by P2X7 receptor stimulation in murine macrophages is mediated by c-Src/Pyk2 and ERK1/2*. *Biochim Biophys Acta*, 2013. **1830**(10): p. 4650-9.
318. Daou, G.B. and A.K. Srivastava, *Reactive oxygen species mediate Endothelin-1-induced activation of ERK1/2, PKB, and Pyk2 signaling, as well as protein synthesis, in vascular smooth muscle cells*. *Free Radic Biol Med*, 2004. **37**(2): p. 208-15.
319. Yuan, Y., D. Beitner-Johnson, and D.E. Millhorn, *Hypoxia-inducible factor 2alpha binds to cobalt in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. **288**(4): p. 849-54.
320. Voelkel, N.F., et al., *Antioxidants for the treatment of patients with severe angioproliferative pulmonary hypertension?* *Antioxid Redox Signal*, 2013. **18**(14): p. 1810-7.
321. Bell, E.L., et al., *Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-inducible factor-dependent extension of the replicative life span during hypoxia*. *Mol Cell Biol*, 2007. **27**(16): p. 5737-45.
322. Chandel, N.S., et al., *Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(20): p. 11715-20.
323. Shi, C.S. and J.H. Kehrl, *PYK2 links G(q)alpha and G(13)alpha signaling to NF-kappa B activation*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(34): p. 31845-50.
324. Wouters, B.G. and M. Koritzinsky, *Hypoxia signalling through mTOR and the unfolded protein response in cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2008. **8**(11): p. 851-64.
325. Kumar, A., et al., *Nuclear factor-kappaB: its role in health and disease*. *J Mol Med (Berl)*, 2004. **82**(7): p. 434-48.

326. Chen, L.F. and W.C. Greene, *Shaping the nuclear action of NF-kappaB*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(5): p. 392-401.
327. Misra, A., et al., *Nuclear factor-kappaB protects the adult cardiac myocyte against ischemia-induced apoptosis in a murine model of acute myocardial infarction*. Circulation, 2003. **108**(25): p. 3075-8.
328. Gordon, J.W., Shaw, J.A., Kirshenbaum, L.A., *Multiple facets of NF-kB in the heart: to be or not to NF-kB*. Circ Res, 2011. **108**(9): p. 1122-32.
329. Nakashima, H., et al., *Inhibition of experimental abdominal aortic aneurysm in the rat by use of decoy oligodeoxynucleotides suppressing activity of nuclear factor kappaB and ets transcription factors*. Circulation, 2004. **109**(1): p. 132-8.
330. Gupta, V. and K.J. Grande-Allen, *Effects of static and cyclic loading in regulating extracellular matrix synthesis by cardiovascular cells*. Cardiovasc Res, 2006. **72**(3): p. 375-83.
331. Gayral, S., et al., *Elastin-derived peptides potentiate atherosclerosis through the immune Neu1-PI3Kgamma pathway*. Cardiovasc Res, 2014. **102**(1): p. 118-27.
332. Blaise, S., et al., *Elastin-derived peptides are new regulators of insulin resistance development in mice*. Diabetes, 2013. **62**(11): p. 3807-16.
333. Diez, J., *Altered degradation of extracellular matrix in myocardial remodelling: the growing role of cathepsins and cystatins*. Cardiovasc Res, 2010. **87**(4): p. 591-2.
334. Swarnakar, S., et al., *The apolipoprotein E-dependent low density lipoprotein cholesteryl ester selective uptake pathway in murine adrenocortical cells involves chondroitin sulfate proteoglycans and an alpha 2-macroglobulin receptor*. J Biol Chem, 2001. **276**(24): p. 21121-8.
335. Vassiliou, G. and R. McPherson, *A novel efflux-recapture process underlies the mechanism of high-density lipoprotein cholesteryl ester-selective uptake mediated by the low-density lipoprotein receptor-related protein*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(9): p. 1669-75.
336. Nielsen, M.S., et al., *Segments in the C-terminal folding domain of lipoprotein lipase important for binding to the low density lipoprotein receptor-related protein and to heparan sulfate proteoglycans*. J Biol Chem, 1997. **272**(9): p. 5821-7.
337. Seo, T., et al., *Lipoprotein lipase-mediated selective uptake from low density lipoprotein requires cell surface proteoglycans and is independent of scavenger receptor class B type I*. J Biol Chem, 2000. **275**(39): p. 30355-62.
338. Goldberg, I.J., R.H. Eckel, and R. McPherson, *Triglycerides and heart disease: still a hypothesis?* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011. **31**(8): p. 1716-25.
339. Eghbali, M., *Cardiac fibroblasts: function, regulation of gene expression, and phenotypic modulation*. Basic Res Cardiol, 1992. **87 Suppl 2**: p. 183-9.
340. Caglic, D., et al., *Glycosaminoglycans facilitate procathepsin B activation through disruption of propeptide-mature enzyme interactions*. J Biol Chem, 2007. **282**(45): p. 33076-85.
341. Pungercar, J.R., et al., *Autocatalytic processing of procathepsin B is triggered by proenzyme activity*. FEBS J, 2009. **276**(3): p. 660-8.
342. Ontong, P., et al., *Effect of a cholesterol-rich lipid environment on the enzymatic activity of reconstituted hyaluronan synthase*. Biochem Biophys Res Commun, 2014. **443**(2): p. 666-71.

343. Burns-Kurtis, C.L., et al., *Cathepsin S expression is up-regulated following balloon angioplasty in the hypercholesterolemic rabbit*. Cardiovasc Res, 2004. **62**(3): p. 610-20.
344. Dhalla, N.S., et al., *Subcellular remodelling may induce cardiac dysfunction in congestive heart failure*. Cardiovasc Res, 2009. **81**(3): p. 429-38.
345. Podet, E.J., et al., *Interaction of low density lipoproteins with human aortic elastin*. Arterioscler Thromb, 1991. **11**(1): p. 116-22.
346. Lillie, M.A. and J.M. Gosline, *Effects of lipids on elastin's viscoelastic properties*. Biopolymers, 2002. **64**(3): p. 127-38.
347. Huang, H., et al., *Extracellular signal-regulated kinase activation during cardiac hypertrophy reduces sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2 (SERCA2) transcription*. J Mol Cell Cardiol, 2014. **75**: p. 58-63.
348. Andersson, K.B., Birkeland, J.A., Finsen, A.V., Louch, W.E., Sjaastad, I., Wang, Y., Chen, J., Molkentin, J.D., Chien, K.R., Sejersted, O.M., Christensen, G., *Moderate heart dysfunction in mice with inducible cardiomyocyte-specific excision of the Serca2 gene*. J Mol Cell Cardiol, 2009. **47**(2): p. 180-7.
349. Kho, C., Lee, A., Jeong, D., Oh, J.G., Chaanine, A.H., Kizana, E., Park, W.J., Hajjar, R.J., *SUMO1-dependent modulation of SERCA2a in heart failure*. Nature, 2011. **477**(7366): p. 601-5.
350. Wittmann, T., M.J. Lohse, and J.P. Schmitt, *Phospholamban pentamers attenuate PKA-dependent phosphorylation of monomers*. J Mol Cell Cardiol, 2015. **80**: p. 90-7.
351. Wan, J., et al., *Chronic hypoxia selectively enhances L- and T-type voltage-dependent Ca²⁺ channel activity in pulmonary artery by upregulating Cav1.2 and Cav3.2*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2013. **305**(2): p. L154-64.
352. Larsen, K.O., et al., *Alveolar hypoxia induces left ventricular diastolic dysfunction and reduces phosphorylation of phospholamban in mice*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **291**(2): p. H507-16.
353. Shareef, M.A., L.A. Anwer, and C. Poizat, *Cardiac SERCA2A/B: therapeutic targets for heart failure*. Eur J Pharmacol, 2014. **724**: p. 1-8.
354. Gwathmey, J.K., A. Yerevanian, and R.J. Hajjar, *Targeting sarcoplasmic reticulum calcium ATPase by gene therapy*. Hum Gene Ther, 2013. **24**(11): p. 937-47.
355. Eisner, D., J. Caldwell, and A. Trafford, *Sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase and heart failure 20 years later*. Circ Res, 2013. **113**(8): p. 958-61.
356. Castellano, J., et al., *Hypoxia exacerbates Ca(2+)-handling disturbances induced by very low density lipoproteins (VLDL) in neonatal rat cardiomyocytes*. J Mol Cell Cardiol, 2011. **50**(5): p. 894-902.
357. Caceres, L.C., et al., *Activated alpha(2) macroglobulin induces matrix metalloproteinase 9 expression by low-density lipoprotein receptor-related protein 1 through MAPK-ERK1/2 and NF-kappaB activation in macrophage-derived cell lines*. J Cell Biochem, 2010. **111**(3): p. 607-17.
358. Fuentealba, R.A., et al., *Low density lipoprotein receptor-related protein 1 promotes anti-apoptotic signaling in neurons by activating Akt survival pathway*. J Biol Chem, 2009. **284**(49): p. 34045-53.
359. Yancey, P.G., et al., *Macrophage LRP-1 controls plaque cellularity by regulating efferocytosis and Akt activation*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010. **30**(4): p. 787-95.

-
360. Sato, H., et al., *Mitochondrial reactive oxygen species and c-Src play a critical role in hypoxic response in vascular smooth muscle cells*. Cardiovasc Res, 2005. **67**(4): p. 714-22.
361. Mukhopadhyay, D., et al., *Hypoxic induction of human vascular endothelial growth factor expression through c-Src activation*. Nature, 1995. **375**(6532): p. 577-81.
362. Binnebosel, M., et al., *Influence of small intestinal serosal defect closure on leakage rate and adhesion formation: a pilot study using rabbit models*. Langenbecks Arch Surg, 2011. **396**(1): p. 133-7.
363. Bayer, A.L., et al., *Pyk2 expression and phosphorylation in neonatal and adult cardiomyocytes*. J Mol Cell Cardiol, 2001. **33**(5): p. 1017-30.
364. Jung, Y.J., et al., *IL-1beta-mediated up-regulation of HIF-1alpha via an NFkappaB/COX-2 pathway identifies HIF-1 as a critical link between inflammation and oncogenesis*. FASEB J, 2003. **17**(14): p. 2115-7.
365. Belaiba, R.S., et al., *Hypoxia up-regulates hypoxia-inducible factor-1alpha transcription by involving phosphatidylinositol 3-kinase and nuclear factor kappaB in pulmonary artery smooth muscle cells*. Mol Biol Cell, 2007. **18**(12): p. 4691-7.
366. Yoshida, T., et al., *Transcriptional upregulation of HIF-1alpha by NF-kappaB/p65 and its associations with beta-catenin/p300 complexes in endometrial carcinoma cells*. Lab Invest, 2013. **93**(11): p. 1184-93.
367. Luo, T., Kim, J.K., Chen, B., Abdel-Latif, A., Kitakaze, M., Yan, L., *Attenuation of ER stress prevents post-infarction-induced cardiac rupture and remodeling by modulating both cardiac apoptosis and fibrosis*. Chem Biol Interact, 2015. **225**: p. 90-8.
368. Eckle, T., et al., *Hypoxia-inducible factor-1 is central to cardioprotection: a new paradigm for ischemic preconditioning*. Circulation, 2008. **118**(2): p. 166-75.
369. Holscher, M., et al., *Unfavourable consequences of chronic cardiac HIF-1alpha stabilization*. Cardiovasc Res, 2012. **94**(1): p. 77-86.