

ORIGINAL

La hipoxia estimula la expresión del receptor LRP1 a través del factor de transcripción HIF-1 α en células musculares lisas de pared vascular humana

José Castellano^a, Rosa Aledo^a, Judith Sendra^a, Paula Costales^a, Lina Badimon^{a,b} y Vicenta Llorente-Cortés^{a,*}

^a Centro de Investigación Cardiovascular CSIC-ICCC, Instituto de Investigación Biomédica Sant Pau (IIB-Sant Pau), Barcelona, España

^b CIBER de Obesidad y Nutrición (CIBERObn), España

Recibido el 5 de diciembre de 2011; aceptado el 20 de enero de 2012

Disponible en Internet el 29 de febrero de 2012

PALABRAS CLAVE

Aterosclerosis;
Hipoxia;
Células vasculares;
Low density
lipoprotein
receptor-related
protein-1 (LRP1);
Hypoxia-inducible
factor-1 α (HIF-1 α)

Resumen

Introducción: La hipoxia se considera un factor clave en la progresión de las lesiones ateroscleróticas. El *low density lipoprotein receptor-related protein-1* (LRP1) juega un papel fundamental en la vasculatura. El propósito de este estudio fue investigar el efecto de la hipoxia en la expresión y la función del LRP1 en células musculares lisas vasculares (CMLV) y el papel del factor de transcripción inducible por la hipoxia 1 alfa (HIF-1 α).

Métodos y resultados: Los análisis por PCR a tiempo real y *Western blot* demostraron que la hipoxia (1% O₂) induce la expresión del LRP1 de manera dependiente del tiempo tanto a nivel de ARN mensajero (niveles máximos al cabo de 1 y 2 h) como de proteína (niveles máximos a las 12 y 24 h). El retraso en el incremento hipóxico de la proteína del LRP1 en comparación con el ARNm podría explicarse por la larga vida media que presenta la proteína del LRP1. Los ensayos de actividad luciferasa demostraron que la hipoxia y la acumulación de HIF-1 α inducen la actividad del promotor del LRP1, y que dos elementos de respuesta a la hipoxia (HRE), situados en las posiciones -1072/-1069 y -695/-692 del promotor, participan en la inducción. La inmunoprecipitación de cromatina mostró la unión *in vivo* de HIF-1 α al promotor del LRP1 en CMLV hipóxicas. Los efectos de la hipoxia en la expresión proteica del LRP1 se tradujeron funcionalmente en un incremento de la acumulación de colesterol esterificado (CE) derivado de la captación de lipoproteínas de baja densidad agregadas (LDLag). El bloqueo de la expresión de HIF-1 α inhibió el incremento de la expresión del LRP1 inducido por la hipoxia y la acumulación de CE intracelular derivado de las LDLag, sugiriendo que tanto la sobreexpresión del LRP1 como

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: cllorente@csic-iccc.org (V. Llorente-Cortés).

URL: <http://www.csic-iccc.org/> (V. Llorente-Cortés).

KEYWORDS

Atherosclerosis;
Hypoxia;
Vascular cells;
Low density
lipoprotein
receptor-related
protein-1 (LRP1);
Hypoxia-inducible
factor-1 α (HIF-1 α)

la sobreacumulación de CE en células vasculares hipóxicas dependen de HIF-1 α . Los análisis inmunohistoquímicos mostraron que el LRP1 y el HIF-1 α colocalizan en células vasculares de placas ateroscleróticas avanzadas.

Conclusiones: La hipoxia incrementa la expresión del LRP1 y la acumulación intracelular de CE derivado de LDLag en CMLV humanas a través de la acumulación de HIF-1 α .

© 2011 Elsevier España, S.L. y SEA. Todos los derechos reservados.

Hypoxia stimulates LRP1 expression through HIF-1 α transcription factor in human vascular wall smooth muscle cells

Abstract

Objective: Hypoxia is considered a key factor in the progression of atherosclerotic lesions. Low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) plays a pivotal role in the vasculature. The aims of this study were to investigate the effect of hypoxia on LRP1 expression and function in vascular smooth muscle cells (VSMC) and the role of hypoxia-inducible factor alpha (HIF-1 α). **Methods and results:** Real time PCR and Western blot analysis demonstrated that hypoxia (1% O₂) time-dependently induced LRP1 mRNA (maximum levels at 1-2 hours) and protein expression (maximum levels at 12-24 hours). The delayed hypoxic upregulation of LRP1 protein versus mRNA may be explained by the long half-life of LRP1 protein. Luciferase assays demonstrated that hypoxia and HIF-1 α over-accumulation induced LRP1 promoter activity and that two consensus HRE sites located at -1072/-1069 and -695/-692 participate in the induction. Chromatin immunoprecipitation showed the *in vivo* binding of HIF-1 α to LRP1 promoter in hypoxic VSMC. Hypoxia effects on LRP1 protein expression were functionally translated into an increased cholesteryl ester (CE) accumulation from aggregated LDL (agLDL) uptake. The blockade of HIF-1 α expression inhibited the upregulatory effect of hypoxia on LRP1 expression and agLDL-derived intracellular CE over-accumulation, suggesting that both LRP1 overexpression and CE over-accumulation in hypoxic vascular cells are dependent on HIF-1 α . Immunohistochemical analysis showed the colocalization of LRP1 and HIF-1 α in vascular cells of human advanced atherosclerotic plaques.

Conclusions: Hypoxia upregulates LRP1 expression and agLDL-derived intracellular CE accumulation in human VSMC through HIF-1 α induction.

© 2011 Elsevier España, S.L. and SEA. All rights reserved.

Introducción

La hipoxia juega un papel fundamental en la fisiopatología del cáncer, del infarto de miocardio y de la aterosclerosis. El engrosamiento de la pared arterial asociado a la progresión de la placa aterosclerótica reduce el aporte de oxígeno en ciertas áreas de la íntima vascular^{1,2}. La hipoxia está presente en lesiones ateroscleróticas avanzadas humanas y se correlaciona con la presencia de angiogénesis y de trombosis^{3,4}. La mayoría de las células en zonas hipóxicas de placas ateroscleróticas responden alterando la expresión de genes involucrados en vasculogénesis, angiogénesis, inflamación y deposición lipídica⁵⁻¹¹. Estos genes se activan a través del factor de transcripción inducible por la hipoxia 1 (HIF-1). HIF-1 es un complejo que se forma por la unión de las subunidades HIF-1 α y HIF-1 β . La subunidad HIF-1 α está sujeta a una rápida degradación proteosomal dependiente de la presencia de oxígeno mediante la hidroxilación de residuos de prolina por hidrolasas¹²⁻¹⁴. En presencia de bajas concentraciones de oxígeno, HIF-1 α se acumula y dimeriza con la subunidad HIF-1 β , la cual se expresa de forma constitutiva, permitiendo que el complejo HIF-1 se una a las secuencias HRE (elementos de respuesta a la hipoxia) de los promotores de genes diana¹⁵. Se ha descrito que la acumulación

de HIF-1 α en macrófagos promueve la formación de células espumosas y el desarrollo de la aterosclerosis¹⁶. En modelos experimentales de hipercolesterolemia e hipertensión, HIF-1 α también está asociado a células musculares lisas vasculares (CMLV)^{17,18}. La hipoxia modula procesos clave para la funcionalidad de las CMLV, como la proliferación/migración^{19,20} y la acumulación lipídica²¹. La agregación y la fusión de las lipoproteínas de baja densidad (LDLag), uno de los principales inductores de la formación de células espumosas derivadas de CMLV²²⁻²⁴, se sabe que incrementa en condiciones de hipoxia.²⁵ El *low density lipoprotein receptor-related protein 1* (LRP1), receptor lipoproteico capaz de unir e internalizar LDLag^{23,24}, incrementa por hipercolesterolemia²⁶ e hipertensión²⁷. Las LDLag estimulan la transcripción del LRP1 disminuyendo los niveles de los *sterol regulatory element binding protein* (SREBP)²⁶. El SREBP-1 y el SREBP-2 son factores de transcripción que modulan negativamente la transcripción del LRP1 en CMLV humanas^{28,29}. El incremento del LRP1 por factores de riesgo cardiovascular podría contribuir a la sobreexpresión del LRP1 que se encuentra en las lesiones ateroscleróticas avanzadas³⁰⁻³². Se desconoce si la hipoxia puede modular la expresión del LRP1 en las placas de ateroma humanas, y si es así, no se sabe qué factores podrían estar implicados.

Los objetivos de este trabajo fueron investigar el efecto de la hipoxia en la expresión y la función del LRP1 vascular y los mecanismos moleculares implicados en este efecto.

Material y métodos

Cultivos celulares

Los cultivos de CMLV humanas se obtuvieron a partir de la capa media de arterias coronarias macroscópicamente sanas recogidos de pacientes sometidos a trasplantes cardíacos en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona. Las CMLV fueron aisladas con una modificación de la técnica de explantes previamente descrita²²⁻²⁴. Los explantes se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda con un 5% de CO₂. Después de una semana, las células empezaron a migrar de los explantes y a proliferar cubriendo la superficie de la placa de cultivo. El medio se renovó cada 2 días una vez comenzó el crecimiento de las células, y al cabo de 10 días se obtuvo un alto grado de proliferación. Los explantes se recogieron con pinzas y se colocaron en placas nuevas con medio de cultivo fresco hasta que las células alcanzaron un alto grado de confluencia. Para la caracterización celular se utilizaron marcadores específicos de diferenciación tales como α -actina (45 kDa) y calponina (33 kDa). Las monocapas celulares crecieron en medio 199 suplementado con un 20% de suero fetal bovino (FBS), un 2% de suero humano, 2 mmol/l de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina G y 100 μ g/ml de estreptomycin. Las células quiescentes (expuestas durante 24 h en medio de cultivo con solo un 0,2% de FBS) se sometieron a normoxia (21% O₂) en un incubador Nirco con una mezcla de gases del 74% N₂ y un 5% CO₂, o a hipoxia (1% O₂) en una estación de hipoxia Hypoxic/Anoxic Workstation H35 (Don Whitley Scientific Ltd.) con una mezcla de gases de un 1% O₂, 94% N₂ y 5% CO₂. El estudio fue aprobado por el comité ético institucional del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau y llevado a cabo de acuerdo con la Declaración de Helsinki.

Las células HeLa se mantuvieron en medio DMEM con 100 U/ml de penicilina G y 100 μ g/ml de estreptomycin, suplementado con un 10% de FBS.

Silenciamiento génico del LRP1 y HIF-1 α mediante ARN de interferencia

Para inhibir la expresión del LRP1 en CMLV humanas, las células se transfectaron transitoriamente con un ARN pequeño de interferencia (siARN-LRP1) sintetizado por Ambion de acuerdo con unas secuencias diana del LRP1 previamente publicadas por nuestro grupo^{23,24}. El siARN-LRP1 se trataba de un oligonucleótido de 15 pares de bases (pb), 5'-CGGCGGGGTCAGCAT-3', complementario a los nucleótidos comprendidos entre las posiciones 466 y 481 del ARN mensajero (ARNm) del LRP1. Se utilizó un siARN-aleatorio como control negativo (Ambion, AM 4636) en las transfecciones celulares. El análisis Fasta en las bases de datos génicas mediante el Genetic Computer Group Package indicó que estas secuencias no deberían hibridar con otras secuencias del LRP1 ni con secuencias de otros receptores de las LDL. Para el silenciamiento de HIF-1 α se utilizó un siARN específico (siARN-HIF-1 α) de Applied Biosystems (siARN ID

42840). Las CMLV quiescentes se transfectaron con los siARN mediante la técnica de nucleofección utilizando el kit Human AoSMC Nucleofector de Amaxa de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La concentración final de los siARN para la transfección fue de 0,6 μ mol/l. Al cabo de 48 h después de la transfección, las células se expusieron a normoxia o hipoxia durante los tiempos de estudio y se recogieron mediante raspado en el reactivo TriPure (Roche) para análisis de PCR y *Western blot*.

Aislamiento y modificación de LDL

Las LDL humanas (LDL sin modificar o LDL nativas con densidad entre d_{1,019}-d_{1,063} g/ml) se obtuvieron a partir de una mezcla de sueros de donantes normocolesterolémicos mediante ultracentrifugaciones secuenciales. Las LDL se dializaron y se determinó la concentración proteica utilizando el método del ácido bicinonínico. La concentración de colesterol se determinó con un kit comercial (Boehringer). Las LDL se utilizaron en los experimentos antes de que pasasen 48 h desde su aislamiento. La pureza de las LDL se analizó con un gel de electroforesis (Paragon System, Beckmann). Las LDLag se obtuvieron por agitación intensa de las LDL nativas (LDLn) diluidas en tampón fosfato salino (PBS). La formación de los agregados de LDL se monitorizaron por turbidimetría (absorbancia a 680 nm), como ya se había descrito previamente³³. La ultraestructura de las LDLag obtenidas por agitación intensa fue similar a las LDL modificadas por versicán²⁴, uno de los principales proteoglicanos estructurales condroitín sulfato de la capa íntima arterial.

Determinación del contenido intracelular de colesterol libre, colesterol esterificado y triglicéridos

Las CMLV quiescentes cultivadas en condiciones de normoxia o hipoxia durante 24 h se expusieron durante las últimas 12 h a concentraciones crecientes de LDL. Después del periodo de incubación con las lipoproteínas, las células se lavaron exhaustivamente: 2 veces con PBS, 2 veces con PBS-1% albúmina de suero bovino (BSA) y 2 veces con PBS-1%BSA-100 U/ml heparina antes de ser recogidas en 1 ml de NaOH 0,15 mol/l. La extracción lipídica se realizó utilizando el método de Bligh y Dyer³⁴ con algunas modificaciones menores.³³ Las muestras y concentraciones diferentes de estándares (una mezcla de colesterol, triglicéridos y colesterol palmitato) se aplicaron en placas de cromatografía en capa fina. Las placas se secaron y los puntos se tiñeron de acuerdo con Huber et al.³⁵. Los puntos de la placa cromatográfica correspondientes al colesterol libre (FC), a los triglicéridos (TG) y a los ésteres de colesterol (CE) se cuantificaron por densitometría mediante la utilización de la curva de estándares y de un densitómetro (Molecular Dynamics).

Mutagénesis dirigida en construcciones del promotor LRP1

Para este estudio se construyó un plásmido con el promotor del LRP1 unido al gen reportero de la luciferasa.

Inicialmente se amplificó por PCR un fragmento del promotor del gen del LRP1 que contenía la secuencia que va desde la posición -1305 hasta +341 (considerando que la transcripción empieza en el nucleótido +1) con los cebadores: 5'-CTGTTTCTGCCAAGGACAGACTGG-3' y 5'-CTGGTGCCTTTGCCGAAGGAAAGA-3'. El fragmento se clonó en el vector pGL3 (Promega) entre las zonas de restricción NheI-HindIII. El ADN para la PCR se obtuvo de células humanas sanguíneas. La secuencia del promotor comentada anteriormente (GI: 34338) y que contiene los lugares de unión para determinados factores de transcripción se analizó mediante el programa MatInspector (Genomatix). Este programa mostró dos posibles secuencias HRE (HRE-1: desde -1072 hasta -1069, y HRE-2: desde -695 hasta -692) dentro del promotor del LRP1.

Para evaluar la relevancia de estas posibles secuencias HRE en la modulación del LRP1 por la hipoxia, realizamos una serie de delecciones en la construcción del promotor del LRP1 con el fin de eliminar la posible HRE-2 o las dos posibles HRE. Las delecciones se realizaron con los siguientes cebadores directos: 5'-ACCGCTGGTGACTCACCTCTCAA-3' (que elimina la HRE-2) o 5'-CTAGAGTATGACTGAGTTT-3' (que elimina las dos secuencias HRE), y sus correspondientes cebadores reversos complementarios. Para mutar la secuencia HRE-1 en la posición -1072 y la HRE-2 en la posición -695 seleccionamos los siguientes cebadores directos:

5'-GGCTCCATCCCGAGCCCTTTTCGGGCGGACAAGCTCC-3' y 5'-GGGGCAGTGACCAAAAGTTTTCTACTGGCCCCTGGG-AACCG-3' (las bases mutadas aparecen subrayadas), y sus correspondientes oligonucleótidos reversos complementarios. Se utilizó el kit de mutagénesis dirigida Quickchange II (Stratagene). Los plásmidos resultantes se aislaron y sus secuencias se confirmaron por digestión con enzimas de restricción y secuenciación del ADN.

Transfecciones transitorias para estudios de actividad del promotor LRP1

Para estudiar la actividad transcripcional del promotor humano del LRP1 en condiciones de hipoxia, se transfectaron cultivos de células HeLa con las construcciones truncadas, mutadas y *wildtype* descritas anteriormente, y se sometieron a normoxia o hipoxia. Para comprobar que el efecto de la hipoxia se debía a la acción de HIF-1 α , se realizaron experimentos de cotransfección en los que se transfectó, además de las construcciones con el promotor, un vector de sobreexpresión de HIF-1 α (pHIF-1 α , cedido por el Dr. Luis del Peso, Departamento de Bioquímica de la Universidad Autónoma de Madrid) en condiciones de normoxia o un vector vacío (pcADN3). En las transfecciones se utilizó el reactivo Lipofectamina-Plus (Invitrogen).

En los ensayos de cotransfección, las células se recogieron en tampón de lisis y la sobreexpresión de HIF-1 α se analizó por *Western blot*. Las transfecciones se realizaron en placas de 12 pocillos con 0,5 μ g de ADN plasmídico/pocillo y 2 μ l de lipofectamina durante 3 h. Transcurridas las 3 h, se cambió el medio y se incubó durante 24 h. Al día siguiente las células se llevaron a quiescencia durante 24 h más y finalmente se expusieron a normoxia o hipoxia durante 18 h. Los extractos celulares se recogieron según las indicaciones del kit Dual Luciferase assay (Promega). La lectura se

realizó utilizando un luminómetro de placas Berthold-Orion. Los valores de la actividad luciferasa se normalizaron respecto a la concentración total de proteína. En las transfecciones en las que se analizó la actividad basal realizamos cotransfecciones con un plásmido que tiene clonado el gen de la Renilla. En estos experimentos los valores de luciferasa se normalizaron por la actividad Renilla.

Determinación de la estabilidad del ARNm y de la proteína del LRP1 en condiciones de normoxia e hipoxia

Para determinar si la hipoxia podría alterar la estabilidad del ARNm del LRP1, las CMLV quiescentes se expusieron durante 4 h a normoxia o hipoxia. Después se añadieron a los cultivos 4,5 μ g/ml de actinomicina D (un inhibidor de la transcripción celular) y se devolvieron a las concentraciones de O₂ en las que se encontraban. Las células se recogieron en TriPure (Roche) a diferentes tiempos (1, 2, 3, 6 y 12 h) después de la adición de actinomicina D. Después de purificar el ARN total, la estabilidad del ARNm del LRP1 se determinó por PCR a tiempo real y se calculó como el porcentaje del ARNm inicial que quedaba después de la exposición a actinomicina D.

Para determinar si la sobreexpresión del LRP1 por la hipoxia dependía de la actividad transcripcional, las CMLV controles y pretratadas con actinomicina D durante 4 h se expusieron a normoxia o hipoxia durante 16 h y se recogieron en tampón de lisis (10 μ M Tris-HCl pH 7,5; 150 μ M KCl; 5% Triton X-100) suplementado con el cóctel de inhibidores de proteasas Complete (Roche) para estudios de *Western blot*.

Finalmente, para estudiar la estabilidad de la proteína del LRP1 y determinar su vida media, los cultivos de CMLV quiescentes se expusieron durante 18 h a normoxia o hipoxia. Después se añadieron 100 μ mol/l de cicloheximida (un inhibidor de la síntesis proteica) a los cultivos y se expusieron de nuevo a las concentraciones de O₂ en las que se encontraban. Las células se recogieron en tampón de lisis a diferentes tiempos (1, 2, 3, 6, 12 y 32 h) después de la adición de cicloheximida para la realización de *Western blot*. La estabilidad de la proteína del LRP1 se calculó como la proporción de la proteína inicial restante después del tratamiento con cicloheximida.

Estudios de expresión génica por PCR a tiempo real

Para la extracción del ARN total, las células se lavaron con PBS y se recogieron en el reactivo TriPure (Roche) siguiendo las indicaciones del fabricante. Este método de aislamiento se basa en la diferencia de solubilidad del ARN, del ADN y de la proteína en distintos solventes orgánicos. La integridad del ARN total se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio 100 μ g/ml. La cuantificación del ARN total se realizó leyendo la absorbancia de las muestras a la longitud de onda de 260 nm en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies).

La síntesis del ADN de cadena sencilla copia (cADN) del ARNm presente en la célula se realizó a partir de ~1,5 μ g de ARN total por retrotranscripción utilizando el kit High

Capacity cADN Reverse Transcription (Applied Biosystems). En este protocolo se utilizaron secuencias aleatorias como cebadores y la enzima Multiscribe™ (incluida en el kit) como transcriptasa reversa.

El análisis de la expresión génica se llevó a cabo por PCR a tiempo real en el equipo PCR-7000²⁶ Sequence Detection System de ABI PRISM (Applied Biosystems).

La cuantificación de la expresión génica por PCR se realizó utilizando la TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems) y una mezcla comercial de sonda y cebadores (Assays on Demand, Applied Biosystems) específica para cada gen de estudio. Los assays utilizados se detallan a continuación: LRP1 (Hs00233899_m1), receptor clásico de las LDL o LDLR (Hs00181192_m1), SREBP-1 (Hs00231674_m1) y SREBP-2 (Hs00190237_m1). El gen TBP (4326317E), factor de transcripción de unión a cajas TATA del ADN, se usó como control endógeno.

Análisis proteico por Western blot

Para la extracción de la proteína total las células se lavaron con PBS y se recogieron en el reactivo (Roche) TriPure siguiendo las indicaciones del fabricante. Se obtuvo la proteína siguiendo el método de aislamiento del TriPure según las indicaciones del fabricante, al finalizar se resuspendió en dodecilsulfato sódico (SDS) al 1% y se cuantificó mediante el ensayo del ácido bicinonínico. Las proteínas se separaron en un gel de poliacrilamida al 10% desnaturante (con SDS) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se bloqueó y se incubó con anticuerpos monoclonales contra el LRP1 humano (cadena β del LRP1; Research Diagnostics, clon 8B8 RDI 61067, dilución 1:40) o contra HIF-1 α humano (BD Biosciences, 610958, dilución 1:500). El control de la proteína total cargada en la electroforesis se realizó mediante la tinción de Ponceau de las membranas y la detección del gen endógeno de la β -actina (Abcam, ab8226-100, dilución 1:5000).

Inmunocitoquímicas

Las CMLV se sembraron en cubres de vidrio, se cultivaron y se sometieron a normoxia o hipoxia durante 18 h. Las células fijadas se permeabilizaron y se incubaron con un anticuerpo primario de ratón anti-LRP1 humano (cadena- β , Research Diagnostics, clon 8B8, RDI 61067, dilución 1:5). Las placas se lavaron y se incubaron con el anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de ratón conjugado al fluoróforo FITC (dilución 1:100). Las imágenes de las células marcadas se analizaron a través de un microscopio confocal invertido de fluorescencia (Leica TCS SP2-AOBS, Wetzlar) y se procesaron con el programa informático Leica Standard Software TCS-AOBS. La superficie fluorescente se calculó usando el programa NIH Image software (dominio público, desarrollado por el Dr. Wayne Rasband, National Institutes of Health, versión 1.6, pixel²/célula).

Inmunohistoquímicas

Las arterias coronarias obtenidas de los corazones explantados se cortaron en secciones seriadas de 5 μ m de grosor.

Los anticuerpos primarios utilizados fueron monoclonales de ratón: anti-LRP1 (PRO61067; Fitzgerald), anti-HIF-1 α (Abcam; ab8366) y anti- α -actina (Dako; M851). Después de la incubación con los anticuerpos, se lavaron las secciones, se suprimió la actividad peroxidasa con H₂O₂ y se bloquearon las uniones inespecíficas con suero equino. Los anticuerpos primarios se detectaron usando la técnica de la inmunoperoxidasa gracias a la afinidad avidina-biotina. Las secciones se incubaron con los anticuerpos secundarios biotinilados apropiados (Vector®). El cromógeno usado fue 3,3'-diaminobenzidina. Se utilizó hematoxilina para las tinciones nucleares.

Para los estudios de colocalización se aplicó un método de inmunofluorescencia indirecta. Las secciones se incubaron con anticuerpos primarios monoclonales de ratón anti-HIF-1 α (Abcam, ab8366) y el monoclonal de conejo anti-LRP1 (Epitomics, 2703-1) durante 2 h a temperatura ambiente. Después de varios lavados con PBS (100 mM)/ Triton X-100 al 0,1%, las secciones se incubaron con FITC (515-095-003; Jackson) y con TRITC (R156; Dako) durante 1 h a temperatura ambiente. Entonces se lavaron con PBS 100 mmol/l, pH 7,4 y se montaron con medio Glicergel® (Dako A/S). Las imágenes se capturaron en el microscopio a mediante la cámara Retiga 1300i Fast.

Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina

Para la realización de la inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) se siguieron las indicaciones del kit ExactaChip de R&D Systems (ECP19335). Las CMLV quiescentes y sometidas a normoxia o hipoxia se fijaron durante 15 min a temperatura ambiente con formaldehído al 37% a una concentración final del 1%. La reacción de fijación se detuvo incubando con glicina 5 min a temperatura ambiente a una concentración final de 125 mM. A partir de aquí, las muestras se mantuvieron siempre en hielo y con una mezcla de inhibidores de proteasas (10 μ g/ml leupeptina, 10 μ g/ml aprotinina y 1 mM *phenylmethanesulfonyl fluoride* [PMSF]; todos de Roche). Se lavaron las células tres veces con PBS e inhibidores de proteasas, se recogieron en PBS y, después de centrifugar, se lisaron con tampón de lisis (suministrado por el kit) más inhibidores de proteasas durante 10 min.

Los lisados celulares se sonicaron para fragmentar el ADN en el baño del sonicador Bioruptor UCD-200 de Diagenode, el cual está asociado a un sistema de refrigeración de agua Neslab RTE7 de Thermo Scientific. Se usaron 4 ciclos de sonicación de 15 min. A través de un gel de agarosa se comprobó que los fragmentos de ADN obtenidos tras la sonicación tenían un tamaño que iba desde los 800 a los 200 pb. Para esto se cargó un 0,5% de cada muestra sonicada en el gel.

Una vez fragmentado el ADN, se centrifugaron las muestras durante 10 min a 4 °C, se descartó el pellet con los restos celulares y se continuó el ChIP con los sobrenadantes, que es donde se encuentra el ADN. Se tomó una muestra de cada sobrenadante (un 10% del volumen) como input o ADN total de partida con el que se normalizaron los resultados finales. Los sobrenadantes se diluyeron con tampón de dilución (suministrado por el kit) y se incubaron un mínimo de 2 h a 4 °C en un agitador orbital con 5 μ g del anticuerpo específico anti-HIF-1 α o IgG de cabra (control negativo), ambos anticuerpos suministrados por el kit y biotinilados.

Los fragmentos de ADN unidos a HIF-1 α reconocidos por el anticuerpo anti-HIF-1 α se recuperaron añadiendo bolas magnéticas (MAG999 de R&D con estreptavidina). Después de sucesivos lavados con tampones suministrados por el kit, se añadió una solución de resina quelante (suministrada en el kit) y se hirvieron las muestras durante 10 min para liberar el ADN inmunoprecipitado de las bolas y de los anticuerpos. Finalmente, se precipitaron las bolas unidas a los anticuerpos y se recuperaron los sobrenadantes con el ADN.

El ADN se purificó mediante una extracción con fenol-cloroformo y realizó una PCR a tiempo real con SYBR green de Roche en un equipo PCR-7900 Sequence Detection System de ABIPRISM (Applied Biosystems) para las secuencias HRE. Se usaron los siguientes cebadores:

Para la secuencia HRE-1 (-726/-529) el cebador directo 5'-GGTACTAAGGTGGGCTCCAT-3' y el reverso: 5'-AGGCTGAGCTTTGATTG GA-3'. Para la secuencia HRE-2 (-1192/-1035) el directo: 5'-GCTCCTTGAACCTGACATGC-3' y el reverso: 5'-CCCACACGGGAATGACTT-3'. Se amplificó durante 40 ciclos de 95°C 15 s y 60°C 1 min. Como control positivo, se realizó una PCR a tiempo real para el VEGF humano con cebadores suministrados por el kit.

Los *threshold cycle* (Ct) de todas las muestras fueron normalizados en función de los inputs de partida (Δ Ct). Finalmente, los resultados de las muestras inmunoprecipitadas con el anticuerpo anti-HIF-1 α se corrigieron por los resultados de las IgG ($\Delta\Delta$ Ct).

Análisis estadísticos

Los resultados se expresaron como la media \pm SEM y el número de experimentos se mostró en cada caso. Las diferencias estadísticas entre los controles y los grupos tratados se analizaron por el test no paramétrico de Mann-Whitney para datos pareados. Se consideró significativo un valor de *p* igual o menor a 0,05.

Resultados

La hipoxia incrementa la expresión del LRP1 en CMLV humanas

Los resultados de PCR a tiempo real (fig. 1A) demostraron que la hipoxia inducía la expresión del ARNm del LRP1 en CMLV de una forma dependiente del tiempo. La máxima expresión del ARNm del LRP1 (1,8 veces aproximadamente) se alcanzó después de 60 min de hipoxia y decayó después de 16 h. El ARNm del LDLR se indujo levemente al cabo de 1 h y decayó hasta niveles basales a partir de las 8 h de hipoxia (fig. 1B). Los niveles de expresión del ARNm del SREBP-1 y del SREBP-2 fueron significativamente disminuidos, un $26 \pm 3\%$ y un $54 \pm 2,5\%$, respectivamente, después de 16 h de hipoxia (tabla 1). Experimentos de microscopia confocal demostraron que los niveles del LRP1 eran más elevados en el citoplasma de CMLV hipóxicas que en las células normóxicas (fig. 1C). La cuantificación de la superficie cubierta por la fluorescencia mostró que las CMLV hipóxicas tenían aproximadamente 1,7 veces más marcaje que las células normóxicas (hipoxia: 250 ± 56 vs normoxia: 150 ± 22 ,

Tabla 1 Efecto de la hipoxia sobre los niveles de expresión del ARNm del SREBP-1 y SREBP-2 en células musculares lisas vasculares (CMLV) humanas

Tiempo de exposición a 1%O ₂ (horas)	SREBP-1 ARNm	SREBP-2 ARNm
0	1,35 \pm 0,20	63,10 \pm 4,12
4	1,31 \pm 0,13	65,22 \pm 1,42
8	1,34 \pm 0,16	51,00 \pm 3,43*
16	1,02 \pm 0,31*	29,02 \pm 1,9*

CMLVs quiescentes se expusieron a normoxia (21% O₂) o hipoxia (1% O₂) a diferentes tiempos. Se cuantificaron los niveles de expresión del ARNm del SREBP-1 y del SREBP-2 por PCR a tiempo real a cada tiempo de estudio. Los datos de la PCR se procesaron con un programa informático específico que utiliza los valores de los Ct y los normaliza por el ARNm del gen endógeno (TBP). Los resultados se expresaron como la media \pm SEM de 3 experimentos realizados por duplicado.

* *p* < 0,05 vs controles.

picel²/célula) (fig. 1D). Análisis por *Western blot* demostraron que la hipoxia incrementa los niveles proteicos del LRP1 y de HIF-1 α , aunque a diferentes tiempos (fig. 1E). Los niveles de la proteína del LRP1 se incrementaron desde 1,35 a las 6 hs hasta 2 a las 24 h de hipoxia (fig. 1E-F). Por el contrario, los niveles proteicos de HIF1- α alcanzaron el máximo a tiempos cortos (fig. 1E). Estos resultados muestran diferencias a lo largo del tiempo en el incremento celular del LRP1 y del HIF-1 α en respuesta a situación de hipoxia.

La hipoxia no altera la estabilidad del ARNm ni de la proteína del LRP1

Para comprobar si la hipoxia podría estar influyendo la estabilidad del ARNm del LRP1, se trataron las CMLV con actinomicina D, un inhibidor de la transcripción celular. Inicialmente se preexpusieron las células quiescentes a normoxia o a hipoxia durante 4 h. Entonces se añadió actinomicina D (4,5 μ g/ml) y se devolvieron las células a normoxia o hipoxia. Las células se recogieron a diferentes tiempos después del tratamiento y se procesaron para analizar los niveles de expresión del ARNm del LRP1. La expresión del ARNm permaneció constante durante las 6 primeras horas de tratamiento (datos no mostrados). Al cabo de 12 h desde la adición de la actinomicina D, el ARNm del LRP1 decayó fuertemente tanto en normoxia como en hipoxia (normoxia: hasta un $69\% \pm 0,5$; hipoxia: hasta un $67\% \pm 5$) (fig. 2A). Para confirmar que el incremento de la proteína del LRP1 por la hipoxia dependía de la transcripción, CMLV sin tratar y tratadas con actinomicina D se expusieron a hipoxia. Como se muestra en la figura 2B, el incremento hipóxico del LRP1 se previno completamente en presencia de actinomicina D.

Para medir la estabilidad proteica, se preexpusieron CMLV humanas a normoxia o hipoxia y seguidamente se les adicionó cicloheximida para bloquear la traducción. La expresión proteica del LRP1 permaneció constante durante

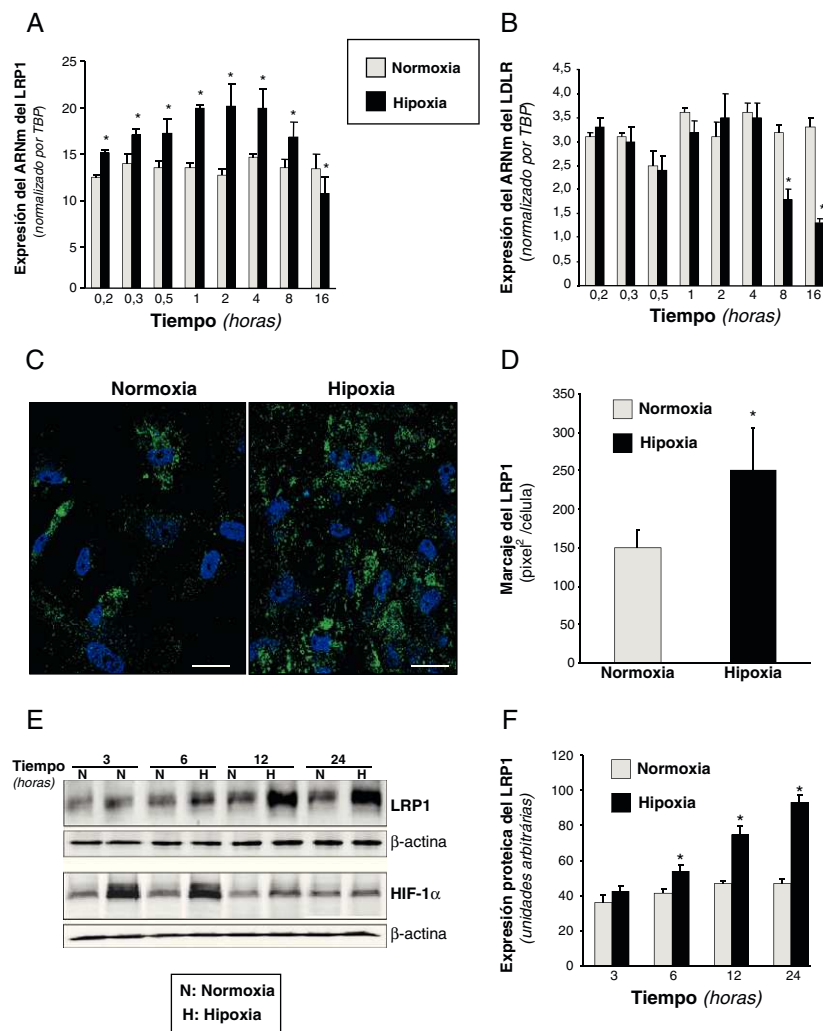


Figura 1 Efecto de la hipoxia en la expresión del ARNm y de la proteína del LRP1 en CMLV humanas. Se expusieron CMLV a normoxia o hipoxia durante tiempos crecientes. Se muestran los niveles de ARNm obtenidos por PCR a tiempo real del LRP1 (A) y del receptor de las LDL (LDLR) (B). Los datos se procesaron con un programa informático específico que utiliza los valores de los Ct y se normalizaron por el ARNm del gen endógeno (TBP). Los resultados están expresados como la media \pm SEM de 3 experimentos independientes realizados por duplicado (* $p < 0,05$ vs CMLV en normoxia). C) Las microfotografías de microscopia confocal muestran el marcaje del LRP1 en CMLV cultivadas en condiciones de normoxia o hipoxia durante 18 h. Las células se lavaron, se fijaron, se permeabilizaron y se incubaron con anticuerpos anti-LRP1 (escala de barra: 10 μ m). D) El diagrama de barras muestra la cuantificación de la superficie cubierta por la fluorescencia en las CMLV normóxicas e hipóxicas (pixel²/célula). Los resultados se muestran como la media \pm SEM de 5 imágenes pertenecientes a 4 experimentos independientes. E) Western blot del LRP1 y de HIF-1 α en CMLV expuestas a normoxia o hipoxia a lo largo del tiempo. Los niveles de α -actina se muestran como control de carga. F) Diagrama de barras de la cuantificación de las bandas del LRP1 en CMLV normóxicas e hipóxicas. Los resultados se expresan como la media \pm SEM de 3 experimentos independientes realizados en duplicado (* $p < 0,05$ vs células control).

las 12 primeras horas de tratamiento con cicloheximida (datos no mostrados). Sin embargo, el porcentaje inicial de la proteína del LRP1 decayó fuertemente a partir de las 12 h (normoxia: hasta un 70% \pm 3,42; hipoxia: hasta un 69% \pm 4,67) y hasta las 32 h (normoxia: hasta un 32% \pm 3,76; hipoxia: hasta un 29% \pm 4,45) (fig. 2C).

Estos resultados sugieren que la vida media de la proteína del LRP1 es de 24 h, independientemente de que las condiciones sean normóxicas o hipóxicas. De forma adicional, estos resultados muestran que tanto la actividad transcripcional como la translacional son necesarias para el incremento del LRP1 por hipoxia.

La hipoxia incrementa los niveles de HIF-1 α y su unión al promotor LRP1 en CMLV humanas

Se analizó el promotor del gen del LRP1 mediante la utilización del programa MatInspector (Genomatix) y se detectó la presencia de dos posibles secuencias HRE (CACG): HRE-1 y HRE-2 en las posiciones -695/-692 y -1072/-1069 respectivamente (fig. 3A).

Los resultados de Western blot mostraron que los niveles proteicos de HIF-1 α de CMLV estaban significativamente inducidos a los 30 min de exposición a hipoxia, y que alcanzaban el máximo después de 2 h (fig. 3B).

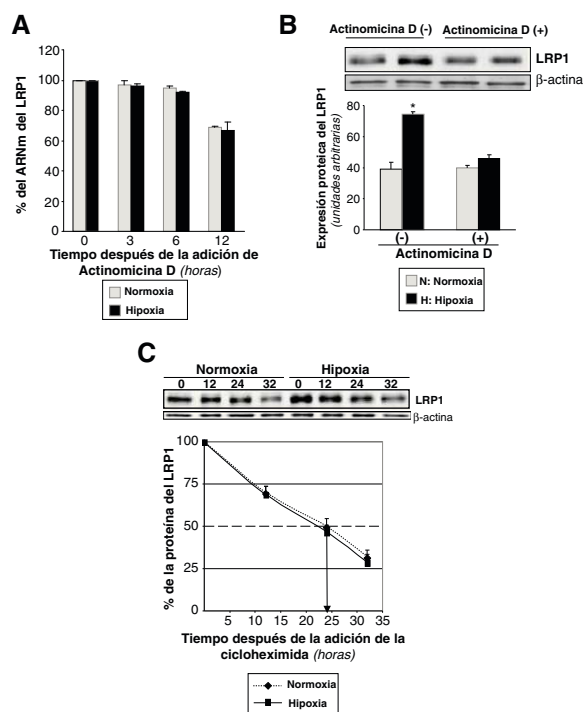


Figura 2 Efecto de la hipoxia en la estabilidad del ARNm y de la proteína del LRP1. A) CMLV quiescentes se preexpusieron a normoxia o hipoxia durante 4 h. Después se añadió actinomicina D (4,5 μ g/ml) y se continuó la exposición de las células a normoxia e hipoxia, respectivamente. Las células fueron recogidas a los tiempos indicados y el ARNm fue analizado por PCR a tiempo real. El valor de expresión del LRP1 a las 0 h se estableció como el 100% y se utilizó para determinar el porcentaje de ARNm del LRP1 restante después de la adición de la actinomicina D. Los resultados están expresados como la media \pm SEM de 2 experimentos independientes realizados por triplicado. B) CMLV se incubaron en presencia o ausencia de actinomicina D (4,5 μ g/ml) y se expusieron a normoxia o hipoxia durante 16 h. Las células se recogieron y se procesaron para *Western blot*, como se explica en la metodología. Los resultados están expresados como la media \pm SEM de 2 experimentos independiente realizados por triplicado (* $p < 0,05$ vs células en normoxia). C) CMLV se preexpusieron a normoxia o hipoxia durante 24 h y seguidamente se incubaron con cicloheximida (100 μ mol/l) durante los tiempos indicados. Las células se recogieron y procesaron para *Western blot*. Los niveles de α -actina se muestran como control de carga. El gráfico de líneas muestra el porcentaje de proteína del LRP1 restante después de la adición de la cicloheximida. Los resultados están expresados como la media \pm SEM de 2 experimentos independientes realizados por triplicado. Las flechas indican el tiempo en que la proteína se encuentra reducida al 50% (vida media).

Los ensayos de inmunoprecipitación de cromatina realizados en CMLV demostraron que HIF-1 α se une a las secuencias HRE-1 y HRE-2 en el promotor del LRP1 *in vivo* (fig. 3C). Aunque la unión de HIF-1 α a las dos secuencias ya se detectaba a los 30 min de hipoxia, la máxima unión a ambos elementos se alcanzó transcurridas las 2 h de hipoxia. La unión de HIF-1 α a la secuencia HRE-2 fue superior que a la HRE-1 a las 2 y a las 4 h. Como era de esperar^{36,37},

encontramos una unión muy fuerte de HIF-1 α al promotor de VEGF (control positivo) después de 30 min de hipoxia (fig. 3C).

La hipoxia incrementa la actividad transcripcional del promotor LRP1 a través de dos secuencias HRE

Para investigar el papel de las secuencias HRE-1 y HRE-2 en la modulación hipóxica del promotor del LRP1, realizamos transfecciones transitorias utilizando construcciones del promotor del LRP1 con las dos secuencias HRE (de -1305 a +341), con la HRE-1 (de -803 a +341), sin secuencias HRE (de -131 a +341) y con las dos secuencias HRE mutadas. Utilizamos células HeLa debido a que son un modelo ideal para realizar transfecciones^{38,39} y analizar los lugares de unión del complejo HIF1 en el promotor de genes que se inducen por la hipoxia. Como se muestra en la figura 4A, la hipoxia (24 h) incrementó 3,5 veces la actividad transcripcional del promotor salvaje del LRP1, y 2,6 veces la del promotor con la HRE-1 mutada. La hipoxia, sin embargo, solo incrementó moderadamente la actividad del promotor mutado en la HRE-2 (menos de 2 veces) y no ejerció ningún efecto en la construcción sin secuencias HRE.

De acuerdo con estos resultados, la sobreexpresión de HIF-1 α que da lugar a una alta acumulación de HIF-1 α (fig. 4B), multiplica por 2 la actividad transcripcional del promotor salvaje del LRP1. Por el contrario, en los promotores con las cajas HRE-1 y HRE-2 mutadas, solo incrementa la actividad en 1,6 y 1,3 veces, respectivamente (fig. 4C).

Estos datos sugieren que ambas secuencias HRE juegan un papel en el efecto inductor que la hipoxia ejerce sobre el promotor del LRP1, aunque la secuencia localizada en -1072/-1069 (HRE-2) parece ser más relevante.

La hipoxia incrementa la captación de LDL agregadas mediada por el receptor LRP1 en CMLV humanas

Para estudiar las consecuencias funcionales de la sobreexpresión del LRP1 inducida por la hipoxia, analizamos el efecto de la hipoxia en la captación de LDLag, un ligando del LRP1 en CMLV²²⁻²⁴. Comparamos el efecto de concentraciones crecientes de LDL nativas (LDL_n) y LDLag (0, 25, 50 y 100 μ g/ml) en el contenido intracelular de CE de CMLV expuestas a condiciones de normoxia e hipoxia. La hipoxia incrementó la acumulación de CE derivado de LDLag (100 μ g/ml) desde $35,7 \pm 0,7$ hasta $50,5 \pm 1,6$ μ gCE/mg de proteína (fig. 5B). Por el contrario, las condiciones hipóxicas no alteraron significativamente la acumulación de CE derivado de LDL_n a ninguna concentración (fig. 5A). El FC intracelular no varió como consecuencia del tratamiento con lipoproteínas en CMLV ni en normoxia ni en hipoxia. Sin embargo, el contenido intracelular de TG incrementó significativamente 1,5 veces en CMLV hipóxicas, independientemente de la presencia o no de LDL. Este resultado podría explicarse por el efecto, previamente descrito en macrófagos¹¹, que la hipoxia ejerce incrementando la biosíntesis de TG.

Para demostrar que el LRP1 es el responsable de la sobreacumulación de CE inducida por la hipoxia en CMLV expuestas a LDLag, comparamos el cambio en el contenido

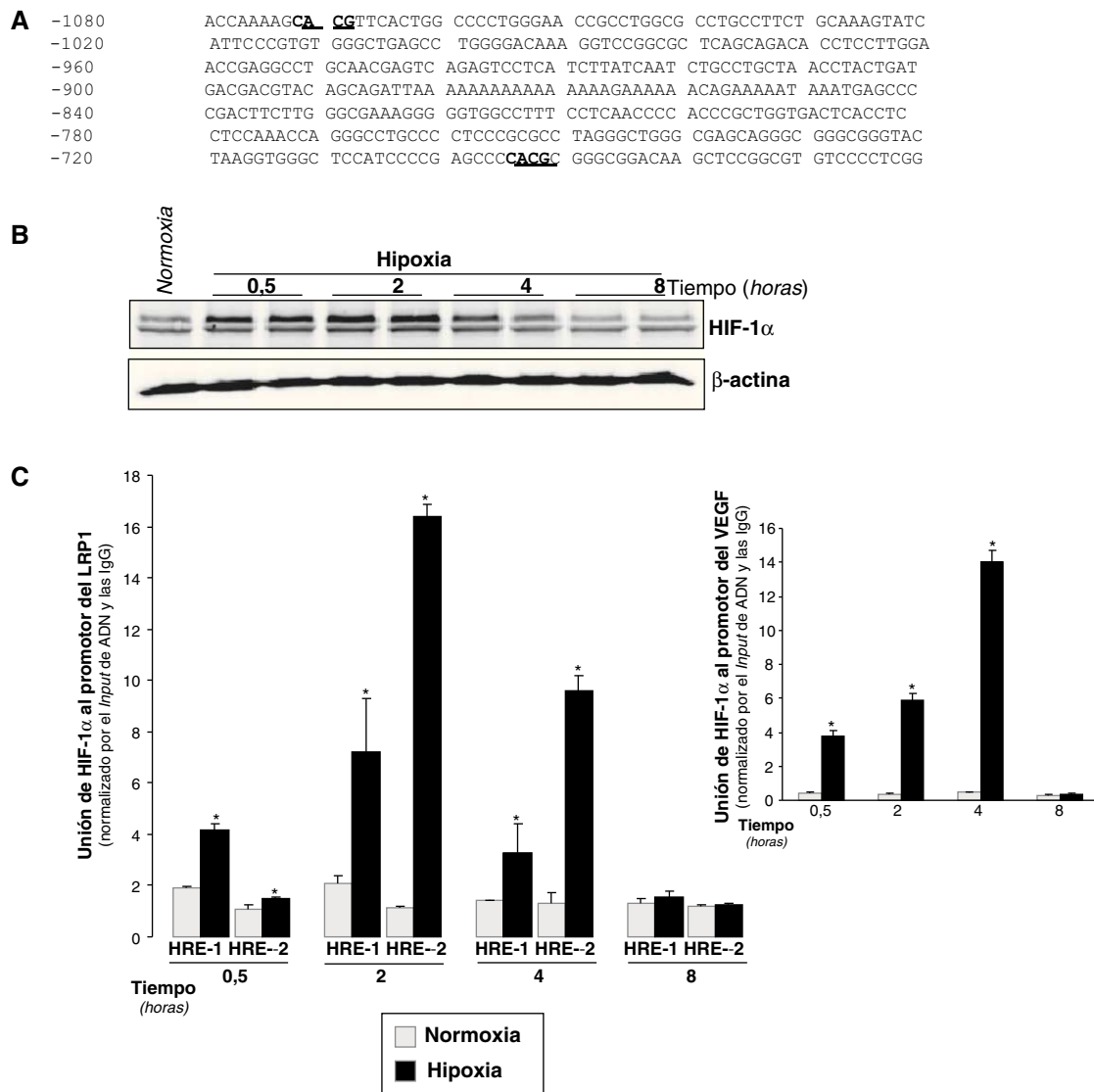


Figura 3 Inducción de HIF-1 α y de su unión al promotor del LRP1 con el tiempo de exposición de CMLV humanas a hipoxia. CMLV quiescentes se expusieron tanto a normoxia como a hipoxia durante 0,5, 2, 4 y 8 h. A) Representación esquemática de la región del promotor del LRP1 con 2 posibles secuencias HRE en las posiciones -1072/-1069 (HRE-2) y -695/-692 (HRE-1), indicadas con el texto subrayado. B) Representación de un *Western blot* que muestra los niveles proteicos de HIF-1 α con el tiempo de exposición de CMLV a hipoxia. Los niveles de α -actina se muestran como controles de carga. C) El ensayo de inmunoprecipitación de cromatina muestra la asociación relativa de HIF-1 α a las secuencias HRE-1 y HRE-2 del promotor del LRP1 *in vivo*. La cromatina se rompió por sonicación y las inmunoprecipitaciones se realizaron con un anticuerpo anti-HIF-1 α o con IgG no específicas de cabra como control negativo. La unión relativa de HIF-1 α *in vivo* se cuantificó por PCR a tiempo real utilizando cebadores específicos para el promotor del LRP1. También se realizaron PCR de los inputs (ADN total de partida). Los Ct de las muestras inmunoprecipitadas con el anticuerpo específico anti-HIF-1 α y con las IgG no específicas se normalizaron por los Ct de los inputs (Δ Ct). Los resultados obtenidos con el anticuerpo específico se normalizaron por aquellos obtenidos con las IgG ($\Delta\Delta$ Ct). Los resultados están expresados como la media \pm SEM de 3 experimentos realizados en duplicado (* $p < 0,01$ vs controles en normoxia).

intracelular lipídico inducido por la hipoxia en células controles, nucleofectadas con un siARN aleatorio y nucleofectadas con un siARN específico para el LRP1 (siARN-LRP1). Como se muestra en la [figura 6A](#), el LRP1 se bloqueó completamente con el tratamiento del siARN-LRP1. La hipoxia multiplicó la acumulación de CE por 1,72 en las células tratadas con el siARN aleatorio, pero no alteró la acumulación de CE en las tratadas con el siARN-LRP1

([fig. 6B](#)). Como era de esperar, el incremento hipóxico de los TG fue similar en las células tratadas tanto con el siARN aleatorio como con el específico para el LRP1 e independientemente de la presencia o ausencia de LDLag (datos no mostrados). No se encontraron diferencias entre el contenido de colesterol intracelular de células control (nucleofectadas sin siARN) y de células tratadas con el siARN aleatorio.

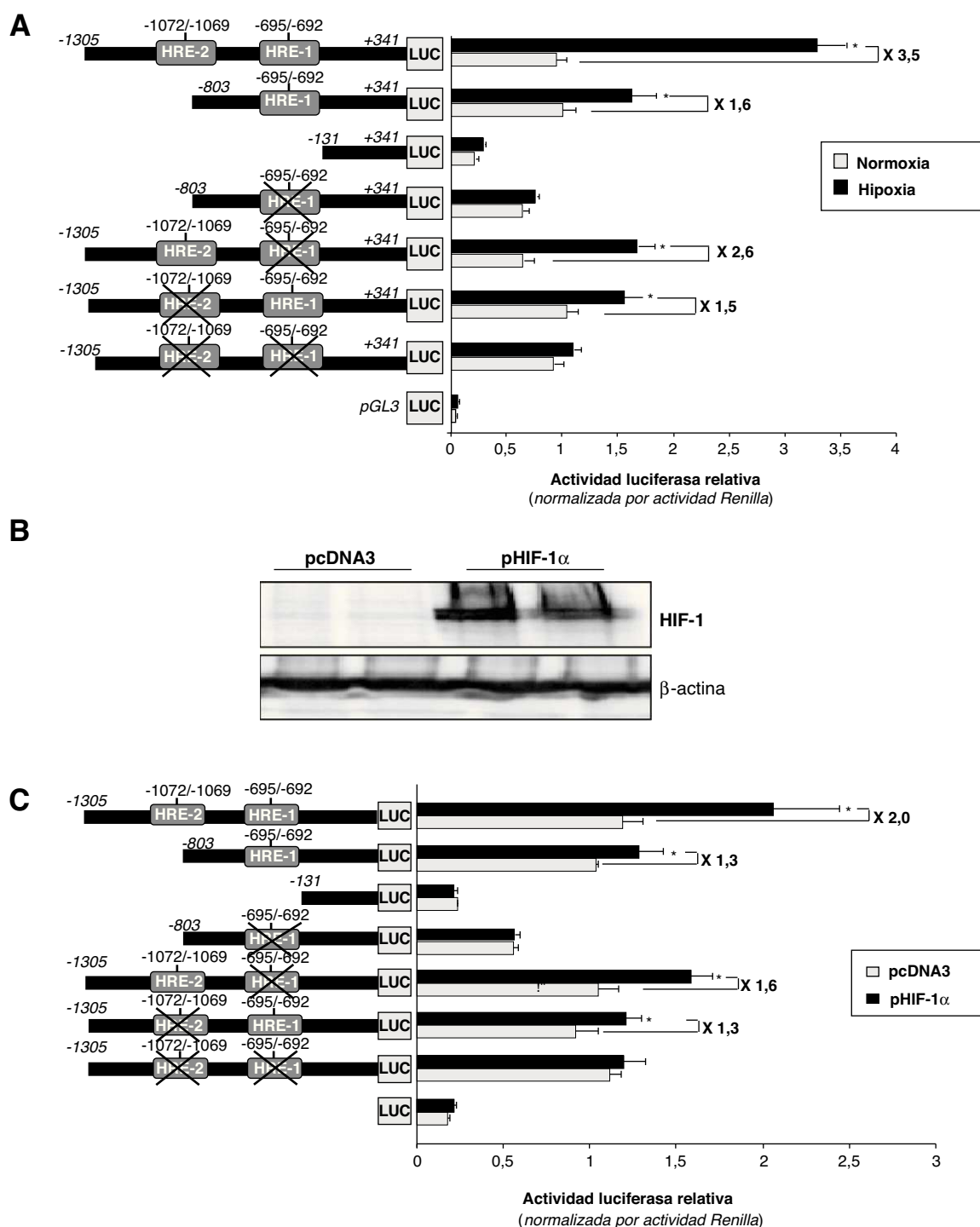


Figura 4 Efecto de la hipoxia en la actividad del promotor LRP1. A) Diferentes regiones del promotor del LRP1 (de -1035 a +341, de -183 a +341, y de +131 a +341) se clonaron en el vector pGL3, el cual posee el gen de la luciferasa, para generar construcciones con secuencias HRE salvajes y mutadas. Se transfecaron células HeLa con estas construcciones del promotor del LRP1 (0,5 μ g/well) y después de 24 h las células se expusieron a normoxia (barras grises) o hipoxia (barras negras) durante 24 h más. Los lisados celulares se utilizaron para determinar la actividad de los promotores y se normalizaron por la actividad Renilla. Los resultados están expresados como la media \pm SEM de 4 experimentos realizados por triplicado (* p < 0,05 vs controles). B) Las células HeLa se mantuvieron en normoxia y se transfecaron con 100 ng del vector de expresión de HIF-1 α (pHIF-1 α) o el correspondiente vector pcADN3 vacío (como control). Después de 24 h, se recogieron las células para determinar la expresión proteica y la actividad luciferasa. Los análisis de *Western blot* muestran la sobreexpresión de HIF-1 α en las células transfectadas con el pHIF-1 α vs aquellas transfectadas con el pcADN3. Los niveles de α -actina se muestran como controles de carga. C) Los lisados de las células transfectadas con pHIF-1 α o pcADN3 se utilizaron para determinar la actividad luciferasa y se normalizó por Renilla. Los resultados están expresados como la media \pm SEM de dos experimentos realizados por triplicado (* p < 0,05 vs controles en normoxia).

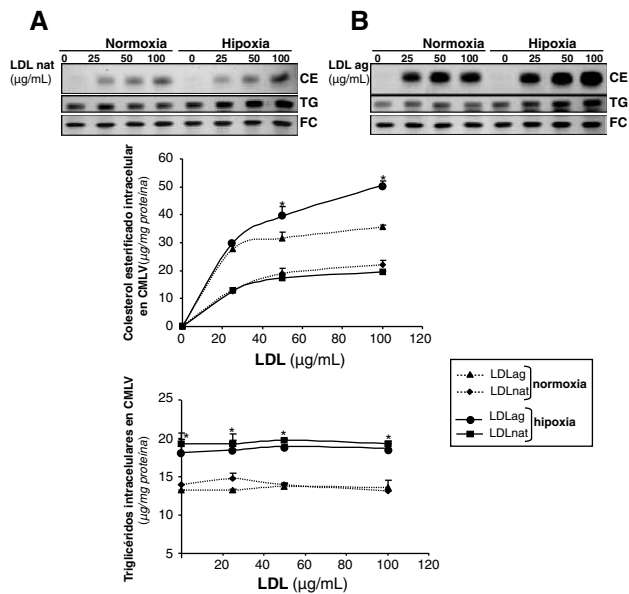


Figura 5 Comparación del efecto de las LDL nativas y las LDLag en el contenido intracelular de colesterol esterificado, triglicéridos y colesterol libre en CMLV expuestas a normoxia o hipoxia. Se expusieron CMLV quiescentes a condiciones de normoxia o hipoxia durante 24 h y durante las últimas 12 h se incubaron con 0, 25, 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LDL nativas (LDLn) (A) o LDLag (B). Las células se recogieron para realizar una extracción lipídica, como se explica en la metodología. Los lípidos se separaron en una cromatografía en capa fina y se revelaron las bandas del contenido intracelular de colesterol esterificado (CE), triglicéridos (TG) y colesterol libre (FC). Los resultados están expresados como microgramos de colesterol por miligramo de proteína y se muestra la media \pm SEM de 3 experimentos realizados por duplicado (* $p < 0,05$ vs controles normóxicos).

La hipoxia no incrementa la expresión del LRP1 ni la acumulación de colesterol esterificado derivado de LDL agregadas en CMLV deficientes en HIF-1 α

Para determinar la implicación de HIF-1 α en el incremento hipóxico del LRP1, inhibimos la expresión de HIF-1 α en CMLV humanas mediante la nucleofección con un siARN específico para HIF-1 α (siARN-HIF-1 α). El siARN-HIF-1 α , pero no el siARN aleatorio, previno el incremento de los niveles proteicos de HIF-1 α inducidos por la hipoxia (4,2 veces) (fig. 7A). La hipoxia no ejerció ningún efecto ni en la expresión proteica (fig. 7B) ni en la del ARNm del LRP1 (fig. 7C) en las células deficientes en HIF-1 α , pero sí incrementó la expresión del LRP1 en las células controles y en las nucleofectadas con el siARN aleatorio. En concordancia, la hipoxia incrementó en 1,8 veces el contenido de CE en CMLV controles o transfectadas con el siARN aleatorio, pero no tuvo efecto en las células deficientes para HIF-1 α (fig. 7D). Como era de esperar, el contenido de TG se incrementó en las células controles o transfectadas con el siARN aleatorio, pero no en las deficientes para HIF-1 α .

Estos resultados demuestran que tanto el incremento del LRP1 como la sobreacumulación de CE derivado de LDLag, ambos inducidos por la hipoxia, son dependientes de HIF-1 α .

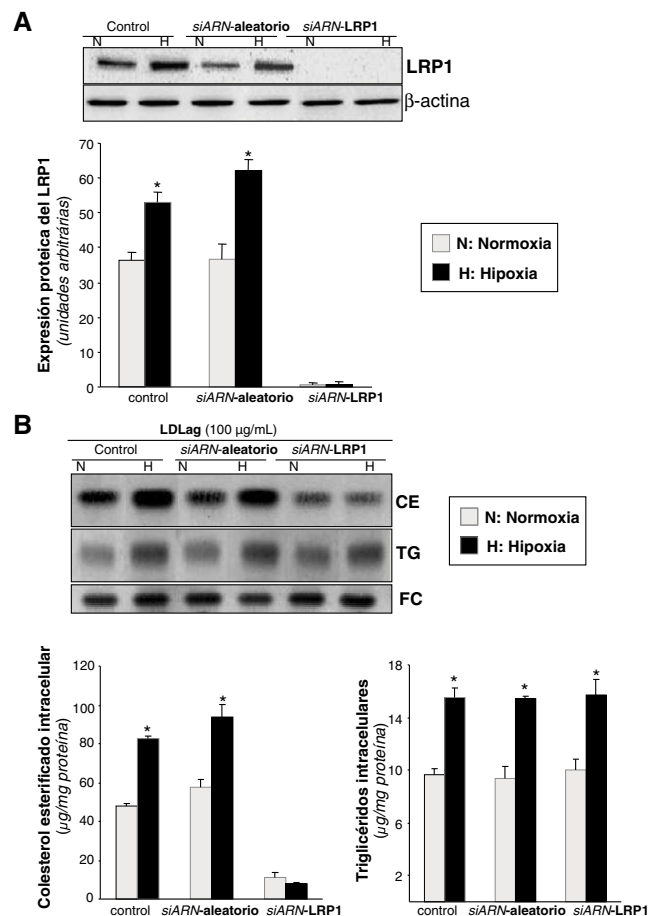


Figura 6 Efecto de la inhibición del LRP1 en la sobreacumulación de colesterol esterificado derivado de LDLag inducido por la hipoxia. Las CMLV se nucleofectaron con un siARN-LRP1 o un siARN-aleatorio (0,6 $\mu\text{mol}/\text{l}$) como control. También se utilizaron como control células nucleofectadas en ausencia de siARN. Después de 48 h de transfección, las CMLV se expusieron a normoxia (N) o hipoxia (H) y se recogieron al cabo de 24 h para evaluar la expresión del LRP1. A) El Western blot y el diagrama de barras muestran la cuantificación de la expresión proteica del LRP1. Los niveles de α -actina se muestran como controles de carga. Los resultados están expresados como la media \pm SEM de 2 experimentos realizados por triplicado (* $p < 0,05$ vs controles en normoxia). B) En los experimentos de carga lipídica, CMLV quiescentes se nucleofectaron con el siARN-LRP1 o el siARN-aleatorio (0,6 $\mu\text{mol}/\text{l}$) y las células control se nucleofectaron en ausencia de siARN. Después de 48 h de transfección, las CMLV se sometieron a normoxia o hipoxia durante 24 h, de las cuales, las últimas 12 h también se incubaron con LDLag (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Las células se recogieron para realizar una extracción lipídica, como se explica en la metodología. Los lípidos se separaron en una cromatografía en capa fina, se revelaron las bandas del contenido intracelular de colesterol esterificado (CE), triglicéridos (TG) y colesterol libre (FC); los histogramas muestran la cuantificación de las bandas de las CMLV sometidas a normoxia o hipoxia. Los resultados están expresados como microgramos de colesterol por miligramo de proteína y se muestra la media \pm SEM de 3 experimentos realizados por triplicado (* $p < 0,05$ vs controles en normoxia).

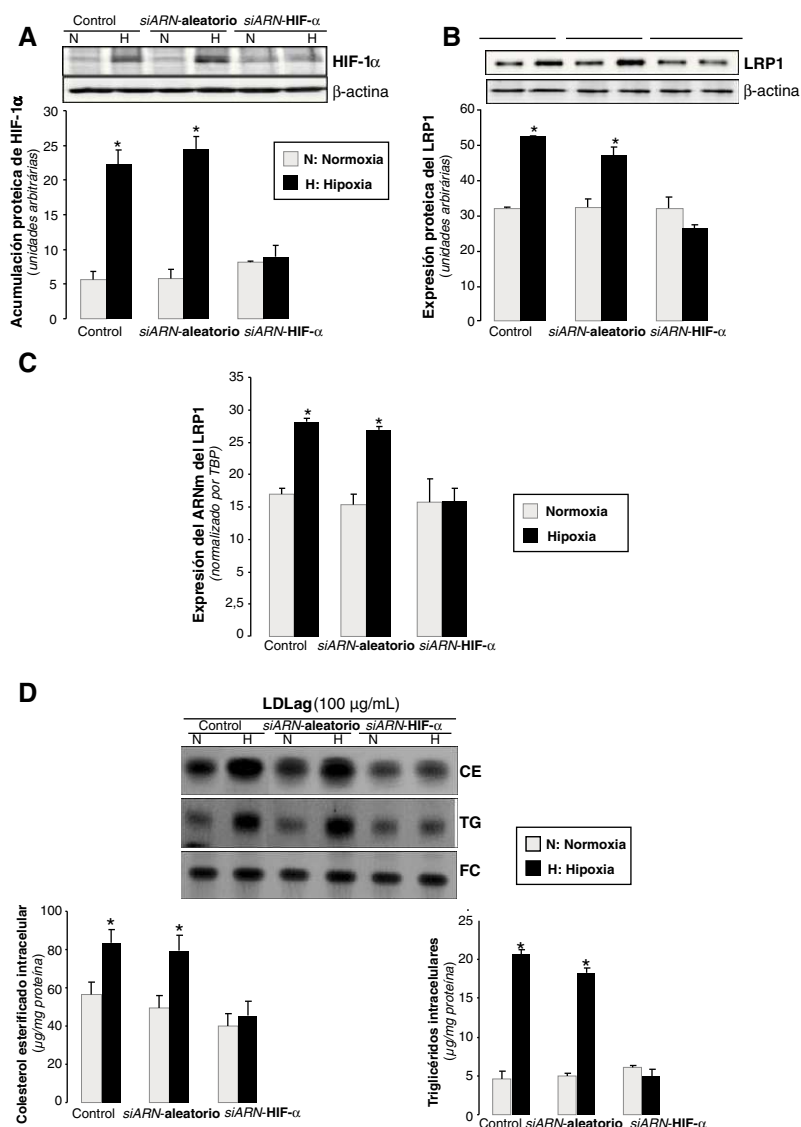


Figura 7 Efecto de la inhibición del HIF-1α en la expresión del LRP1 inducida por la hipoxia. Las CMLV se nucleofectaron con un siARN-HIF-1α o un siARN-aleatorio (0,6 μmol/l). Las células control se nucleofectaron en ausencia de siARN. Después de 48 h de transfección, las CMLV se expusieron a normoxia (N) o hipoxia (H) y se recogieron a las 2 h para evaluar la acumulación de HIF-1α, o a las 18 h para estudiar la expresión del LRP1 y el contenido de lípido intracelular. Está representado el Western blot y el diagrama de barras con la cuantificación proteica de HIF-1α (A) y del LRP1 (B). Los niveles de α-actina se muestran como controles de carga. Los resultados están expresados como la media ± SEM de 2 experimentos realizados por triplicado (* p < 0,05 vs controles normóxicos). C) Cuantificación de los niveles de expresión del ARNm del LRP1 detectados por PCR a tiempo real. Los resultados de la PCR se procesaron con un programa informático específico que utiliza los valores de los Ct normalizados por el gen endógeno (TBP). Los resultados están expresados como la media ± SEM de 2 experimentos realizados por triplicado (* p < 0,05 vs controles). D) En los experimentos de carga lipídica, CMLV quiescentes fueron nucleofectadas con el siARN-LRP1 o el siARN-aleatorio (0,6 μmol/l). Las células control se nucleofectaron en ausencia de siARN. Después de 48 h de transfección, las CMLV se sometieron a normoxia o hipoxia durante 24 h, de las cuales las últimas 12 h también se incubaron con LDLag (100 μg/ml). Las células se recogieron para realizar una extracción lipídica, como se explica en la metodología. Los lípidos se separaron en una cromatografía en capa fina, se revelaron las bandas del contenido intracelular de colesterol esterificado (CE), triglicéridos (TG) y colesterol libre (FC); los histogramas muestran la cuantificación de las bandas. Los resultados están expresados como microgramos de colesterol por miligramo de proteína y se muestra la media ± SEM de 3 experimentos realizados por triplicado (* p < 0,05 vs controles en normoxia).

Asociación entre el LRP1 y HIF-1α en CMLV de lesiones ateroscleróticas avanzadas humanas

Para saber si la regulación al alza del LRP1 por HIF-1α se da en CMLV de placas de ateroma, realizamos análisis

inmunohistoquímicos. La [figura 8A](#) muestra una tinción tricrómica de Masson de una lesión aterosclerótica avanzada y de una zona normal utilizada como control. Tanto el factor de transcripción HIF-1α como el receptor LRP1 estaban altamente expresados en las zonas más profundas de

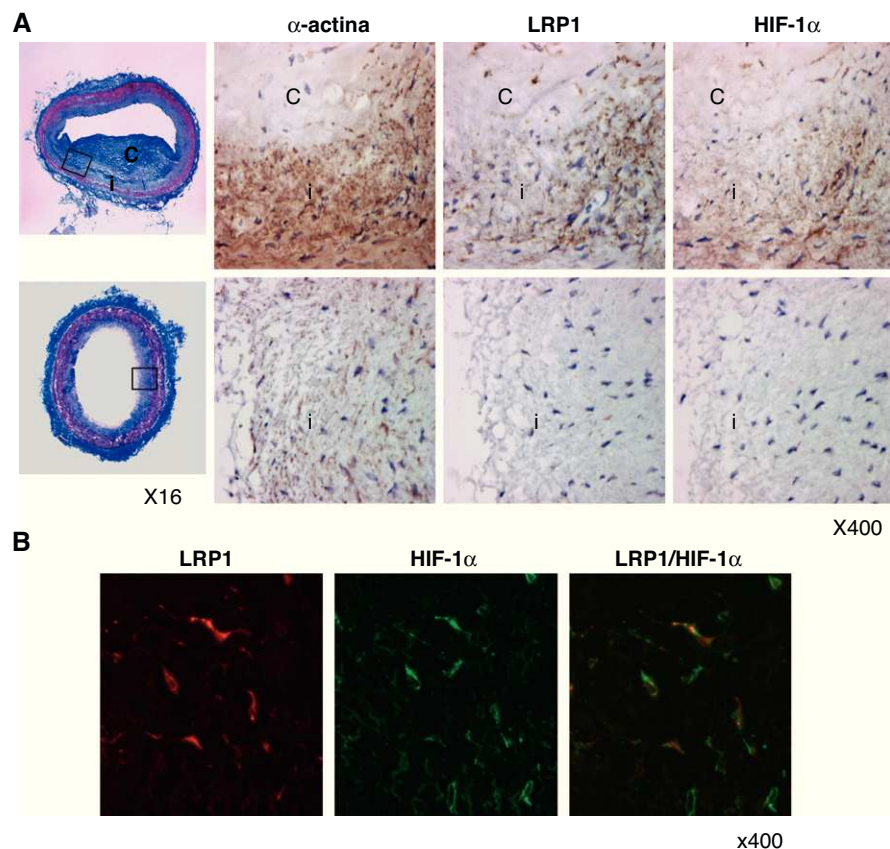


Figura 8 HIF-1 α colocaliza con el LRP1 en CMLV de lesiones ateroscleróticas humanas avanzadas. A) Tinción tricrómica de Masson de lesiones ateroscleróticas avanzadas humanas (paneles superiores) y de zonas sin lesión (paneles inferiores). Se muestra el marcaje representativo de la α -actina, el LRP1 y HIF-1 α (i, íntima; c, core lipídico). Los rectángulos indican las zonas seleccionadas para el aumento. B) Las imágenes de microscopía de inmunofluorescencia muestran en amarillo la colocalización del LRP1 (en rojo) y HIF-1 α (en verde) en células vasculares de lesiones ateroscleróticas avanzadas.

la capa íntima, coincidiendo con células positivas para la α -actina (marcador específico de CMLV). Por el contrario, un leve marcaje para HIF-1 α y LRP1 se observó en las zonas control. En los experimentos de doble inmunofluorescencia, el marcaje específico para el LRP1 y para el HIF-1 α se solapaban en las células vasculares de las lesiones (fig. 8B).

Discusión

El LRP1 es esencial para el desarrollo embrionario⁴⁰ y para el mantenimiento de la integridad vascular⁴¹. La expresión del LRP1 en la pared vascular tiene un efecto protector al limitar la señalización a través del receptor PDGF^{42,43}. En placas ateroscleróticas ricas en lípido, el LRP1 podría contribuir a la deposición lipídica debido a su capacidad de unir e internalizar LDLag retenidas en la matriz extracelular, la principal forma de modificación de las LDL en la íntima arterial⁴⁴⁻⁴⁶. Los análisis por PCR a tiempo real y *Western blot* de este estudio demuestran que la hipoxia induce fuertemente la expresión del ARNm y de la proteína del LRP1 en CMLV humanas, de la misma manera que ya se había visto previamente en líneas celulares tumorales^{47,48}. En las CMLV humanas la inducción máxima del LRP1 por la hipoxia a nivel

de ARNm ocurre al cabo de 1 h, y a nivel proteico a las 16 h. La inducción más retardada de la proteína de este receptor por la hipoxia parece deberse a la larga vida media de la proteína del LRP1 en CMLV humanas. Los datos de nuestros experimentos con actinomicina D demuestran que la sobreexpresión del LRP1 inducida por la hipoxia depende de la transcripción, ya que la actinomicina D previene completamente este efecto de la hipoxia. La similitud entre el patrón de expresión del ARNm del LRP1 a lo largo del tiempo y el patrón de acumulación de la proteína de HIF-1 α , ambos en hipoxia, apoya nuestra hipótesis de que HIF-1 α modula la transcripción del promotor del LRP1. La inhibición específica de HIF-1 α previene casi por completo la sobreexpresión del LRP1 inducida por la hipoxia en CMLV humanas. El análisis de la región 5' del promotor humano del LRP1 reveló la existencia de dos posibles secuencias HRE que, de acuerdo con los ensayos de ChIP, tienen la capacidad de unir HIF-1 α *in vivo*. La unión máxima de HIF-1 α a estas secuencias coincidió en el tiempo con el máximo de acumulación de HIF-1 α . Los estudios de actividad luciferasa demostraron que tanto la HRE-1 como la HRE-2 juegan un papel fundamental en la inducción del promotor LRP1 que ejerce la hipoxia y la sobreacumulación de HIF-1 α , aunque la HRE-2 (-1072/-1069) parece más importante. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el ChIP, los cuales muestran una mayor unión *in vivo* de

HIF-1 α a la secuencia HRE-2 que a la HRE-1 en el promotor del LRP1. Estos resultados obtenidos por diferentes aproximaciones experimentales demuestran que HIF-1 α media, al menos en parte, el efecto de la hipoxia sobre la transcripción del LRP1.

De forma interesante, también encontramos que la hipoxia disminuía los niveles del SREBP-1 y del SREBP-2 en las CMLV humanas. Mediante la disminución de los niveles de los SREBP, la hipoxia causó una reducción en la expresión del receptor de las LDL y probablemente esto también contribuyó a incrementar el LRP1. Anteriormente se había demostrado en nuestro grupo que de forma contraria a lo que pasaba con el receptor de las LDL, el LRP1 se regulaba negativamente por los SREBP^{31,32}. Hay resultados controvertidos en la literatura en relación al efecto que la hipoxia ejerce sobre la expresión de los SREBP. Mientras algunos autores han publicado que se da una reducción en los niveles de los SREBP⁴⁹, otros muestran resultados opuestos^{50,51}. Estas discrepancias han sido explicadas por una modulación diferencial de los factores de transcripción por hipoxia, dependiendo del tipo celular^{52,53}. De hecho, las diferencias en la modulación de los SREBP por la hipoxia explicaría por qué el LRP1 disminuye en CMLV cerebrales⁵⁴ mientras que se incrementa en CMLV coronarias.

Nuestros resultados muestran que la inhibición de HIF-1 α no solo previene la acumulación de TG inducida por la hipoxia¹¹, sino también la sobreacumulación de CE derivado de la captación de LDLag. Por lo tanto, además de los SREBP^{26,31,32}, HIF-1 α también contribuye claramente a modular la acumulación lipídica intracelular derivada de LDLag y mediada por el LRP1 en CMLV humanas. La internalización de LDLag mediada por el LRP1 es uno de los principales mecanismos que contribuye a la formación de células espumosas derivadas de CMLV en condiciones de hiperlipidemia experimental e hipertensión^{22-24,26,27}. De forma muy interesante, las células espumosas colocalizan con la proteína de HIF-1 α en zonas con lípido de lesiones ateroscleróticas avanzadas humanas^{3,4}. Las células espumosas no solo derivan de macrófagos, sino también de CMLV^{55,56}. Nuestros resultados inmunohistoquímicos muestran que el LRP1 y el HIF-1 α colocalizan en placas ateroscleróticas avanzadas humanas enriquecidas en lípido. El incremento en la expresión del LRP1 por un efecto combinado de la sobreacumulación de HIF-1 α (inducida por la hipoxia) y la disminución de los SREBP (inducida por la presencia de lípido y por la hipoxia) podría ser relevante *in vivo*, ya que las zonas hipóxicas están frecuentemente asociadas con el lípido de las lesiones ateroscleróticas avanzadas^{3,4}. El LRP1, además de ser un receptor de membrana, es un transductor de señales que se desplaza a las caveolas como respuesta a señales extracelulares^{57,58}; de este modo, sería de interés saber si la hipoxia podría alterar la distribución subcelular del LRP1.

En resumen, los resultados de este estudio muestran que tanto HIF-1 α como el LRP1 están incrementados en las CMLV hipóxicas, y que el marcaje proteico de HIF-1 α y del LRP1 coinciden en CMLV de placas de ateroma avanzadas. Todos estos resultados de forma conjunta demuestran que las CMLV hipóxicas podrían contribuir a los elevados niveles de HIF-1 α asociados a las células espumosas en lesiones ateroscleróticas avanzadas humanas^{3,4}.

Financiación

Este trabajo se hizo posible gracias a la financiación del CIBE-ROBN03/2006, REDINSCOR RD06/0003/0015 y FIS PI080351 del Instituto Salud Carlos III, cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (F.E.D.E.R.), MARATÓ TV3-Malalties Cardiovasculars, SAF 2006/10009, Fundación Lilly y FIC-F.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Los autores quieren dar las gracias al equipo de trasplantes de corazón del Servicio de Cardiología y Cirugía Cardíaca del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau en Barcelona. También agradecemos el apoyo técnico de Laura Nasarre y Marta Sánchez. L.B., V.L.L.-C. y J.C. son miembros del programa de graduación internacional PROMISE (IRTG-1566), apoyado por el Deutsche Forschungsgemeinschaft (Bonn, Alemania).

Bibliografía

- Björnheden T, Levin M, Evaldsson M, Wiklund O. Evidence of hypoxic areas within the arterial wall in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:870-6.
- Nakano D, Hayashi T, Tazawa N, Yamashita C, Inamoto S, Okuda N, et al. Chronic hypoxia accelerates the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. *Hypertens Res.* 2005;28:837-45.
- Sluimer JC, Gasc JM, van Wanroij JL, Kisters N, Groeneweg M, Sollewijn Gelpke MD, et al. Hypoxia, hypoxia-inducible transcription factor, and macrophages in human atherosclerotic plaques are correlated with intraplaque angiogenesis. *J Am Coll Cardiol.* 2008;51:1258-65.
- Sluimer JC, Daemen MJ. Novel concepts in atherogenesis: angiogenesis and hypoxia in atherosclerosis. *J Pathol.* 2009;218:7-29.
- Semenza GL. Regulation of vascularization by hypoxia-inducible factor 1. *Ann N Y Acad Sci.* 2009;1177:2-8.
- Rey S, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor-1-dependent mechanisms of vascularization and vascular remodelling. *Cardiovasc Res.* 2010;86:236-42.
- Murdoch C, Muthana M, Lewis CE. Hypoxia regulates macrophage functions in inflammation. *J Immunol.* 2005;175:6257-63.
- Moreno PR, Purushothaman KR, Fuster V, Echeverri D, Truszczynska H, Sharma SK, et al. Plaque neovascularization is increased in ruptured atherosclerotic lesions of human aorta: implications for plaque vulnerability. *Circulation.* 2004;110:2032-8.
- Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Finn AV, Gold HK, Tulenko TN, et al. Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:2054-61.
- Sirol M, Moreno PR, Purushothaman KR, Vucic E, Amirbekian V, Weinmann HJ, et al. Increased neovascularization in advanced lipid-rich atherosclerotic lesions detected by gadofluorine-M-enhanced MRI: implications for plaque vulnerability. *Circ Cardiovasc Imaging.* 2009;2:391-6.
- Boström P, Magnusson B, Svensson PA, Wiklund O, Borén J, Carlsson LM, et al. Hypoxia converts human macrophages into triglyceride-loaded foam cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:1871-6.

12. Kaelin Jr WG, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell*. 2008;30:393–402.
13. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, et al. Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science*. 2001;292:468–72.
14. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, et al. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*. 1999;399:271–5.
15. Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J. Harnessing the hypoxia-inducible factor in cancer and ischemic disease. *Biochem Pharmacol*. 2007;73:450–7.
16. Jiang G, Li T, Qiu Y, Rui Y, Chen W, Lou Y. ARN interference for HIF-1 α inhibits foam cell formation in vitro. *Eur J Pharmacol*. 2007;562:183–90.
17. Kuwahara F, Kai H, Tokuda K, Shibata R, Kusaba K, Tahara N, et al. Hypoxia-inducible factor-1 α /vascular endothelial growth factor pathway for adventitial vasa vasorum formation in hypertensive rat aorta. *Hypertension*. 2002;39:46–50.
18. Herrmann J, Lerman LO, Rodriguez-Porcel M, Holmes Jr DR, Richardson DM, Ritman EL, et al. Coronary vasa vasorum neovascularization precedes epicardial endothelial dysfunction in experimental hypercholesterolemia. *Cardiovasc Res*. 2001;51:762–6.
19. Osada-Oka M, Ikeda T, Imaoka S, Akiba S, Sato T. VEGF-enhanced proliferation under hypoxia by an autocrine mechanism in human vascular smooth muscle cells. *J Atheroscler Thromb*. 2008;15:26–33.
20. Zhang R, Wu Y, Zhao M, Liu C, Zhou L, Shen S, et al. Role of HIF-1 α in the regulation ACE and ACE2 expression in hypoxic human pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2009;297:L631–40.
21. Wada Y, Sugiyama A, Yamamoto T, Naito M, Noguchi N, Yokoyama S, 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;22:1712–9.
22. 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;26:117–23.
23. 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;20:1572–9.
24. Llorente-Cortés V, Otero-Viñas M, Hurt-Camejo E, Martínez-González J, Badimon L. Human coronary smooth muscle cells internalize versican-modified LDL through LDL receptor-related protein and LDL receptors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:387–93.
25. Oörni K, Kovanen PT. Enhanced extracellular lipid accumulation in acidic environments. *Curr Opin Lipidol*. 2006;17:534–40.
26. 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;106:3104–10.
27. 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;78:581–9.
28. Llorente-Cortés V, Costales P, Bernués J, Camino-López S, Badimon L. Sterol regulatory element-binding protein-2 negatively regulates low density lipoprotein receptor-related protein transcription. *J Mol Biol*. 2006;359:950–60.
29. Costales P, Aledo R, Vernia S, Das A, Shah VH, Casado M, 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;213:458–68.
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;34:182–90.
31. Moestrup SK, Gliemann J, Pallesen G. Distribution of the α 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein in human tissues. *Cell Tissue Res*. 1992;269:375–82.
32. Luoma J, Hiltunen T, Särkioja T, Moestrup SK, Gliemann J, Kodama T, et al. Expression of α 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein and scavenger receptor in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest*. 1994;93:2014–21.
33. Llorente-Cortés V, Martínez-González J, Badimon L. 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;18:738–46.
34. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*. 1959;37:911–6.
35. Huber LA, Xu QB, Jurgens G, Bock G, Buhler E, Gey KF, et al. Correlation of lymphocyte lipid composition membrane viscosity and mitogen response in the aged. *Eur J Immunol*. 1991;21:2761–5.
36. Berra E, Pagès G, Pouyssegur J. MAP kinases and hypoxia in the control of VEGF expression. *Cancer Metastasis Rev*. 2000;19:139–45.
37. Rebar EJ. Development of pro-angiogenic engineered transcription factors for the treatment of cardiovascular disease. *Expert Opin Investig Drugs*. 2004;13:829–39.
38. Firth JD, Ebert BL, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Oxygen-regulated control elements in the phosphoglycerate kinase 1 and lactate dehydrogenase A genes: similarities with the erythropoietin 3' enhancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:6496–500.
39. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:5510–4.
40. Willnow TE. The low density lipoprotein receptor gene family: multiple roles in lipid metabolism. *J Mol Med*. 1999;77:306–15.
41. Boucher P, Gotthardt M, Li WP, Anderson RG, Herz J. LRP: role in vascular wall integrity and protection from atherosclerosis. *Science*. 2003;300:329–32.
42. 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;277:15507–13.
43. Loukinova E, Ranganathan S, Kuznetsov S, Gorlatova N, Migliorini MM, Loukinov 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.
44. Frank JS, Fogelman AM. Ultrastructure of the intima in WHHL and cholesterol-fed rabbit aortas prepared by ultra-rapid freezing and freeze-etching. *J Lipid Res*. 1989;30:967–78.
45. Hakala JK, Oörni K, Pentikäinen MO, Hurt-Camejo E, Kovanen PT. Lypolysis of LDL by human secretory phospholipase A2 induces particle fusion and enhances the retention of

- LDL to human proteoglycans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:1053–61.
46. Guyton JR, Klemp KF, Mims PM. Altered ultrastructural morphology of self-aggregated low density lipoproteins: coalescence of lipid domains forming droplets and vesicles. *J Lipid Res.* 1991;32:953–61.
47. Wykoff CC, Pugh CW, Maxwell PH, Harris AL, Ratcliffe PJ. Identification of novel hypoxia dependent and independent target genes of the von Hippel-Lindau (VHL) tumour suppressor by mARN differential expression profiling. *Oncogene.* 2000;19:6297–305.
48. Koong AC, Denko NC, Hudson KM, Schindler C, Swiersz L, Koch C, et al. Candidate genes for the hypoxic tumor phenotype. *Cancer Res.* 2000;60:883–7.
49. Dolt KS, Karar J, Mishra MK, Salim J, Kumar R, Grover SK, et al. Transcriptional downregulation of sterol metabolism genes in murine liver exposed to acute hypobaric hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;354:148–53.
50. Li J, Thorne LN, Punjabi NM, Sun CK, Schwartz AR, Smith PL, et al. Intermittent hypoxia induces hyperlipidemia in lean mice. *Circ Res.* 2005;97:698–706.
51. Furuta E, Pai SK, Zhan R, Bandyopadhyay S, Watabe M, Mo YY, et al. Fatty acid synthase gene is up-regulated by hypoxia via activation of Akt and sterol regulatory element binding protein-1. *Cancer Res.* 2008;68:1003–11.
52. Kelly BD, Hackett SF, Hirota K, Oshima Y, Cai Z, Berg-Dixon S, et al. Cell type-specific regulation of angiogenic growth factor gene expression and induction of angiogenesis in nonischemic tissue by a constitutively active form of hypoxia-inducible factor 1. *Circ Res.* 2003;93:1074–81.
53. Karakiulakis G, Papakonstantinou E, Aletras AJ, Tamm M, Roth M. Cell type-specific effect of hypoxia and platelet-derived growth factor-BB on extracellular matrix turnover and its consequences for lung remodelling. *J Biol Chem.* 2007;282:908–15.
54. Bell RD, Deane R, Chow N, Long X, Sagare A, Singh I, et al. SRF and myocardin regulate LRP-mediated amyloid-beta clearance in brain vascular cells. *Nat Cell Biol.* 2009;11:143–53.
55. Raines EW, Ross R. Smooth muscle cells and the pathogenesis of the lesions of atherosclerosis. *Br Heart J.* 1993;69:S30–7.
56. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis—an update. *N Engl J Med.* 1986;314:488–500.
57. Zhang H, Links PH, Ngsee JK, Tran K, Cui Z, Ko KW, et al. Localization of low density lipoprotein receptor-related protein 1 to caveolae in 3T3-L1 adipocytes in response to insulin treatment. *J Biol Chem.* 2004;279:2221–30.
58. 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.