



Mecanismes de regulació de la Lisil Oxidasa i la Fibulina-5 a nivell vascular: modulació per hipòxia

Anna Guadall Roldán

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) 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. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (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) 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. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (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 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 neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This 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.

Mecanismes de regulació de la Lisil Oxidasa i la Fibulina-5 a nivell vascular: modulació per hipòxia.

Memòria presentada per

Anna Guadall Roldán

per optar al grau de Doctor per la Universitat de Barcelona

Universitat de Barcelona

Facultat de Biologia

Departament de Biologia Cel·lular

Programa de doctorat de Biologia Cel·lular i Molecular

(bienni 2006-2008)

Aquest treball ha estat realitzat sota la direcció de la Dra. M^a Cristina Rodríguez Sinovas i del Dr. José Martínez González, investigadors del Centro de Investigación Cardiovascular de Barcelona.

Els directors:

M^a Cristina Rodríguez Sinovas

José Martínez González

La Tutora:

La doctoranda:

Mercè Durfort i Coll

Anna Guadall Roldán

Barcelona, 2012

Al meu pare.

AGRAÏMENTS

Per fi ha arribat el moment! Però abans que res: GRÀCIES!

GRÀCIES als meus directors de tesi, sense els quals aquest treball no hauria estat possible. Gracias, Cristina, por tu excelente dirección científica, por tu buena orientación, por tu sentido práctico y por tu apoyo. Gracias, Pepe, por tus buenos consejos y por la confianza que has depositado en mí.

GRÀCIES a la Dra. Badimon per haver-me donat l'oportunitat de realitzar la tesi al Centro de Investigación Cardiovascular.

GRÀCIES als companys de laboratori. Als que em van acollir: Berta, Lluís, Crespo (mai mingú m'ha piropejat tant!), María (aunque a veces no te entienda, sé que eres una tía genial! Gracias por tu amistad!), Silvia, sempre somrient (trabajar contigo da gusto!), Paqui, i molt especialment, el Javi (el que el Lluís diria el feo): gràcies pels teus consells i la teva amistat, gràcies a tu començar al laboratori va ser molt més senzill! Gràcies al que també era novato quan vaig arribar, l'Olivier: gracias, Oli, por tu gran amistad y por hacerme partícipe de vuestro día, el tuyo y el de Aurora, fue genial, de verdad. Gràcies als italians, la Gloria, la Sara (me reí mucho contigo!), la Irene i en especial el Maurizio: Gracias, bello, por tu amistad transparente y tu energía positiva! Gracias, Angie, por tu amabilidad, tu simpatía, y tu paciencia en el estabulario. I al tros de pa, el Ricardo, un munt de gràcies, pel seu consell i confiança (ets massa bo!). Gràcies també a les que vingueren més tard, la Judit, la Susana (sempre rient! ets la pera!), l'Aina (moles, tia!), la Beatriz (gracias por tu amabilidad y simpatía! eres muy divertida, sobretodo cuando se te zafa el cable!) i la Ingrid (estàs com un llum! però t'estimem igual! de veritat! que sí! eh! oh! coca amb cireres! visca! és genial que com disfrutes de les petites coses de la vida! espinacs! hem d'aprendre molt de tu! però no a cridar... imagina't quin guirigall...). Gràcies, Nando, aunque no estuviste mucho tiempo con nosotros, demostraste ser un tipo sensible y genial (tros de pa núm. 2). I per últim, sí, tu, et guardava pel final, ja ho saps! A veure si deixes anar la llagrimeta: gràcies, Mar, per ser tant genial, per

la teva amistat, per la teva amabilitat i humanitat. Gràcies per acceptar-me des del principi (disparaaa!), per haver estat tan bona alumna i, evidentment, per estar com una cabra! Gràcies a tu he tingut amb qui compartir grans moments al laboratori (blu!) i amb qui esplaiar-me amb les meves xorrades i jocs de paraules, alhora que una gran confident a qui sé que li puc explicar tot.

GRÀCIES als col·laboradors del Laboratori d'Angiologia, Biologia Vascular i Inflamació i del Servei de Cirurgia Vascular de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, per haver fet possible una part important d'aquest treball: Gràcies, Mercedes Camacho, pels teus infinits consells; Luis Vila, per compartir karaoke tot i no saber la lletra; i José Román Escudero.

GRÀCIES als companys dels altres grups. Gracias Anita, por ser tan genial, eres una de esas pocas personas que transmiten paz y felicidad, gracias por tu amistad! Gràcies a la Maria la russa, por estar tan chalada, por llevarnos al culo del mundo con la señora O'hara y por los bailes irlandeses. Gràcies també al David (tros de pa núm. 3), gràcies per la teva simpatia i bon humor, i per les teves superfestes d'aniversari! Gràcies, Norma, per ser tan alegre i transparent, si tothom fos feliç com tu, el món funcionaria millor! Gràcies, Juli, perquè ets amable perquè sí, honest i altruista. Gràcies Sandra, per la teva inesgotable paciència i la teva gran ajuda en el món del temps real i dels microarrays. Gràcies, Rosa, per la teva simpatia i pels teus consells científics. Gràcies, Oriol i M^a Àngels, per la vostra acollida al laboratori d'histologia, la vostra simpatia i els vostres valuosos consells en aquesta ciència tan inexacta que vosaltres coneixeu tan bé. Gràcies, Jackie, por ser como eres (tienes algo especial!). Gràcies, Maribel, pels teus consells en el món de l'ARN i les RNases, què punyeteres, les ties! Gràcies als companys de ping-pong: gracias, Eli por animarme con nuestro reto. Gràcies, Rodrigo, Roberta, Blanca, Sergi i als jugadors de ping-pong ocasionals, Rafael i Carolina, per la vostra companyonia. Gracias Jose, por todos tus consejos logísticos con la tesis (qué agobio...). Gràcies, Esther, pels teus consells en el món del confocal,

de les cèl·lules que es desenganxen i les pelusetes inoportunes. Gràcies, Nia, Vanessa, Sonia (sempre somrient i cantant!), Patri, Diana i Esther (sempre disposada a ajudar!), per la vostra ajuda en el món dels cultius. I em queda un món, el de l'estabulari: gràcies Laura i Sergi, per les vostres ensenyances i consells; gràcies, Pablo i Ángel, per la vostra gran ajuda i amabilitat, i gracias a tí también Álvaro, por romperte los cuernos pensando qué les puede pasar a mis ratones. Gràcies a tota la resta de companys, Maite (gràcies per somriure sempre!), Paula (por estar también como una cabra!), Marta S. (tu també déu n'hi do! ets molt divertida!), Anna N., Cardús (és il·legal dir a la tesi que moles? no, oi? doncs això, moles!), Laura, Roi, Helena, Marta V., Carlota, Jordi, Judith S., Valentina, Maria B., Maísa, Mónica B. (gràcies pels teus consells nutricionals!), Blanca M., Ilaria, José Luís, Josep, Olaya, Mónica P., i tota la resta, que no són pocs!!!

GRÀCIES a les companyes d'administració i recepció, en especial la Pepy, per ser tan eficient en el (per mi terrible) món de la paperassa, i per la seva simpatia; la Patri, per la seva amabilitat i per preocupar-se tant per informar-me de l'arribada dels meus ratolins; i la Maria, per tenir sempre un somriure a punt.

GRÀCIES al grup dels que, tot i que van marxar, han seguit sempre amb nosaltres: Pablo, María, Elena i Erick, sois todos geniales, de verdad!

GRÀCIES als pamploniques: Guillermo; Sara, por ser tan alegre; y Josean y Ana, por vuestra amabilidad y por haberme acogido tan y tan bien.

GRÀCIES als companys de París. Même si je vous ai connu avant de ma thèse, c'est en fait avec vous que j'ai commencé à "maniper". Merci, Wassim, pour ton énorme patience, pour tes bons conseils de labo et pour ton amitié. Merci, Fabien, pour ta sympathie, ton amitié, et pour chanter au labo, ça a été marrant de manipuler à ton côté. Merci à toi aussi, Sou-Vinh, pour ton amitié. Merci, Manu, c'était toujours rigolo de te rencontrer en culture ou par le couloir. Merci, Yves, el jefe, pour ton

accueil et ta sympathie. Merci, Caro, pour m'avoir donnée l'opportunité de faire l'erasmus avec vous. Merci Sylvie, Olivier et Claude, pour m'accueillir dans votre labo avec plein de sympathie. Merci, Christine, pour ton énorme amitié, j'ai tellement des choses à apprendre de toi! Merci à tous, enfin, pour avoir fait mon séjour si parfait et pour me guider dans mon début au monde scientifique.

GRÀCIES als meus companys de carrera, Enrique i Carlos. Fue un placer compartir los últimos años de carrera con vosotros. Gracias por aguantarme y por vuestra amistad.

GRÀCIES Karel, por estar siempre ahí, por ser un amigo de verdad, y por obsequiarme con tus siempre interesantes conversaciones.

GRÀCIES a les meves amigues. A les del grum: Araceli, Gina i Mar, per ser tan genials, per mantenir la nostra amistat al llarg dels anys i per que sé que sempre podré contar amb vosaltres! Gràcies, Griselda, per haver-me obsequiat amb la teva amistat i també per estar sempre "allà".

GRÀCIES a CBRC, per compartir tots aquests anys de partidetes i demés. Gràcies, Toni, per acompanyar-me a hores intempestives al laboratori per canviar un medi i salvar l'experiment. Gràcies, Jordi, per la teva amistat. Gràcies, Ge, per haver tornat a aparèixer. Gràcies, Benji, per ser tan collonut.

GRÀCIES, Carme, per haver confiat sempre en la meves aptituds científiques i per haver-me tractat tan bé.

GRÀCIES, com no, Poblenou, per haver-me tornat a acollir i per tornar a compartir amb vosaltres carrosses i demés. Gràcies, Glòria, per ser l'amiga de sempre.

GRÀCIES als meus companys de kung-fu. A la Teresa i al Miles, per haver-me introduït al tai-xi; al Ferran i al Geni, per haver-me fet conèixer el choi-li-fut; al Sifu, per haver creat una escola amb tant bon ambient; a tots els companys i companyes de combat i xi-kung, a la Prison, la Susana, i en especial al Jesús, per la seva simpatia i la seva enorme paciència en repetir-me el mateix tots els cops que calgui.

GRÀCIES, finalment, a la meva família. Gràcies, Papa (sé que sempre ets amb mi), per haver confiat en mi i per recolzar-me en tot allò que he volgut fer. Gràcies, Mama, per ser la Muchi més guai i moderna, per ajudar-me en els moments difícils i per haver tingut tanta paciència amb mi. Gràcies a tots els tiets, cosins i nebots, per estimar-me tant. Gràcies laia, per ser tant bona i comprensiva, i per parlar-me de quan eres jove, del laio i del Papa, m'encanta.

GRÀCIES a la meva nova família per haver-me acollit tant bé. En especial als meus sogres, la Magda i el Ramon, i a l'Angelita i la Pepa, per tenir tanta paciència amb la meva dieta.

GRÀCIES, com no, a tu també, guapo! Gràcies Héctor, per haver-me fet descobrir un món nou. Gràcies pel teu amor. Gràcies per tots els moments que passem junts. Gràcies per aguantar-me! Gràcies pel teu suport i la teva comprensió. Gràcies per la teva paciència, sobretot la que has demostrat tenir en aquests darrers mesos. T'estimo.

GRÀCIES A TOTS per haver-me acompanyat durant aquests anys, que per a mi no només han estat una tesi, sinó també un pas més en la meva evolució personal.

GRÀCIES.

CONTINGUT

ABREVIATURES.....	21
INTRODUCCIÓ.....	27
1. LA PATOLOGIA ATROSCLERÒTICA.....	29
1.1. INTRODUCCIÓ.....	29
1.2. ESTRUCTURA DE L'ARTÈRIA.....	29
1.3. L'ENDOTELI VASCULAR.....	30
1.4. LA LESIÓ ATROSCLERÒTICA	31
1.4.1. Hipòtesi de la resposta a la lesió	31
1.4.2. Evolució de la lesió	32
2. L'ANEURISMA D'AORTA ABDOMINAL (AAA).....	36
2.1. EPIDEMIOLOGIA I FACTORS DE RISC	36
2.2. FORMACIÓ DE L'AAA.....	39
3. LA HIPÒXIA.....	41
3.1. INTRODUCCIÓ.....	41
3.2. ELS FACTORS DE TRANSCRIPCIÓ INDUÏBLES PER HIPÒXIA (HIF)	42
3.2.1. La regulació de HIF	43
4. LA LISIL OXIDASA	46
4.1. INTRODUCCIÓ.....	46
4.2. BIOSÍNTESI DE LA LOX	47
4.3. ACTIVITAT CATALÍTICA: Mecanisme de reacció	48
4.4. EXPRESSIÓ I REGULACIÓ DE LA LOX	50
4.5. ALTRES FUNCIONS BIOLÒGIQUES DE LA LOX: activitats intracel·lulars i intranuclears.....	50
4.6. LA LOX EN EL DESENVOLUPAMENT.....	52
4.7. PATOLOGIES RELACIONADES AMB ALTERACIONS EN L'ACTIVITAT LOX	53
4.7.1. LOX i càncer	53
4.7.2. LOX i malalties cardiovasculars	55
5. LA FIBULINA-5	59
5.1. INTRODUCCIÓ.....	59

CONTINGUT

5.2. PROPIETATS FÍSICO-QUÍMIQUES I ESTRUCTURALS	60
5.2.1. Els motius EGF- <i>like</i>	61
5.2.2. El motiu RGD	61
5.3. PATRÓ D'EXPRESSIÓ	61
5.4. INTERACCIONS MOLECULARS	62
5.5. PAPER DE LA FBLN5 EN L'ELASTOGÈNESI	64
5.6. REGULACIÓ DE L'ADHESIÓ, LA PROLIFERACIÓ I LA MIGRACIÓ CEL·LULARS ..	67
5.7. FBLN5 I ANGIOGÈNESI	67
5.8. PATOLOGIES RELACIONADES AMB ALTERACIONS EN LA FIBULINA-5.....	68
5.8.1. FBLN5 i càncer	69
5.8.2. FBLN5 i malalties cardiovasculars	70
OBJECTIUS	73
MATERIAL I MÈTODES	77
1. OBTENCIÓ DE MOSTRES DE PACIENTS	79
2. EXPERIMENTACIÓ ANIMAL	79
2.3. TRACTAMENT D'HIPÒXIA	84
2.4. MANIPULACIÓ I SUPERVISIÓ DELS ANIMALS	85
2.4.1. Manipulació i manteniment dels animals	85
2.4.2. Procediment de supervisió del benestar animal.....	86
3. CULTIUS CEL·LULARS.....	87
3.1. CULTIU PRIMARI DE CÈL·LULES ENDOTELIALS	87
3.1.1. Obtenció i cultiu primari de MLEC.....	88
3.2. CULTIU PRIMARI DE CÈL·LULES MUSCULARS LLISES VASCULARS (CMLV)	89

3.2.1. Obtenció i cultiu primari de cèl·lules musculars murines d'aorta (CMLVm).....	89
3.2.2. Cultiu primari de CMLV humanes.....	89
3.3. CULTIU DE LÍNIES CEL·LULARS.....	90
4. CLONATGE, AMPLIFICACIÓ I PURIFICACIÓ D'ADN PLASMÍDIC.....	90
4.1. OBTENCIÓ DE LA SEQÜÈNCIA A CLONAR (INSERT)	90
4.2. DIGESTIÓ I DEFOSFORILACIÓ DEL PLASMIDI RECEPTOR DE L'INSERT	90
4.3. LLIGACIÓ.....	91
4.4. TRANSFORMACIÓ.....	91
4.4.1. Preparació de bacteris competents	91
4.4.2. Transformació de bacteris competents amb ADN plasmídic	92
4.4.3. Comprovació dels clons.....	92
4.4.4. Purificació d'ADN plasmídic.....	92
5. ANÀLISI D'ACTIVITAT TRANSCRIPCIONAL	93
5.1. GENERACIÓ DE LES CONSTRUCCIONS.....	93
5.1.1. Construccions del promotor de LOX	93
5.1.2. Construccions del promotor de FBLN5.....	94
5.2. ANÀLISI DE SEQÜÈNCIES.....	94
5.3. MUTAGÈNESI DIRIGIDA	94
5.4. TRANSFECCIÓ TRANSITÒRIA I ASSAIG DE LUCIFERASA	95
6. SOBRE-EXPRESSIONIÓ PROTEICA EN CÈL·LULES EN CULTIU	96
6.1. TRANSFECCIÓ TRANSITÒRIA DE CÈL·LULES HeLa	96
6.2. SOBRE-EXPRESSIONIÓ MITJANÇANT TRANSDUCCIÓ LENTIVIRAL.....	96
6.2.1. Clonatge de LOX en el vector lentiviral	96
6.2.2. Producció de lentivirus.....	96
6.2.3. Determinació de la concentració de puomicina i polibrè.....	97
6.2.4. Titulació.....	97
6.2.5. Transducció de HUVEC.....	98
7. SILENCIAMENT DE L'EXPRESSIONIÓ GÈNICA MITJANÇANT siRNA	98

CONTINGUT

8. ANÀLISI D'EXPRESSIÓ	99
8.1. EXTRACCIÓ D'ARN	99
8.2. DETERMINACIÓ DE LA QUANTITAT I QUALITAT DE L'ARN	100
8.3. RT-PCR EN TEMPS REAL.....	100
8.4. MICROARRAYS.....	102
8.4.1. Plataforma d'Applied Biosystems	102
8.4.2. Plataforma d'Affymetrix.....	103
9. ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ PROTEICA	105
9.1. OBTENCIÓ D'EXTRACTES PROTEICS.....	105
9.1.1. Extractes cel·lulars.....	105
9.1.2. Extractes de sobrenedants de cèl·lules en cultiu	105
9.1.3. Extractes de teixit.....	105
9.1.4. Extractes nuclears	106
9.2. WESTERN-BLOT	106
9.3. IMMUNOCITOQUÍMICA	107
10. ANÀLISI DE L'ACTIVITAT LISIL OXIDASA	108
11. ASSAIG DE POLIMERITZACIÓ DE COL·LAGEN	109
12. ANÀLISI DE L'APOPTOSI PER UNIÓ A ANNEXINA V	109
13. ANÀLISI D'UNIÓ PROTEÏNA-ADN	110
13.1. ASSAIG DE RETARD DE LA MOBILITAT ELECTRO-FORÈTICA (<i>EMSA</i>)	110
13.2. IMMUNOPRECIPITACIÓ DE CROMATINA (ChIP).....	111
14. HISTOLOGIA	113
14.1. PROCESSAT DE LES MOSTRES.....	113
14.2. PREPARACIÓ DELS PORTAOBJECTES	113
14.3. TINCIONS I IMMUNOHISTOQUÍMICA.....	113
14.3.1. Tinció Tricròmica de Masson.....	114
14.3.2. Hematoxilina-Eosina.....	114
14.3.3. Immunolocalització de LOX	114
14.3.4. Immunolocalització de FBLN5	115

14.3.5. Captació d'imatges	116
15. ANÀLISI ESTADÍSTICA.....	116
RESULTATS.....	117
1. ESTUDI DE LA REGULACIÓ DE LA LOX PER HIPÒXIA EN CE I DELS MECANISMES IMPLICATS.....	119
1.1. Expressió de LOX a la paret arterial.....	119
1.2. La hipòxia indueix l'expressió de LOX en CE.....	121
1.3. La inducció de la LOX per hipòxia és independent de factors autocrins.....	124
1.4. La hipòxia augmenta l'activitat transcripcional de LOX en CE	126
1.5. L'eix PI3K/Akt/mTOR està involucrat en la inducció de LOX per hipòxia.....	127
1.6. La inhibició de HIF-1 α bloqueja parcialment la regulació de LOX per hipòxia	128
1.7. Les ROS estan involucrades en la regulació de LOX per hipòxia	130
1.8. La via de senyalització de les proteïnes Smad està involucrada en l'increment de l'activitat transcripcional de LOX induïda per hipòxia.....	131
1.9. La hipòxia sistèmica indueix la LOX en teixits vascularitzats.....	133
2. ANÀLISI DE LA REGULACIÓ DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA PER LA LOX.....	136
2.1. Sobre-expressió de la LOX en HUVEC mitjançant un sistema lentiviral.....	136
2.2. Anàlisi per <i>microarrays</i>	138
4. ESTUDI DE LA REGULACIÓ DE LA FBLN5 PER HIPÒXIA I DELS MECANISMES IMPLICATS.....	147
4.1. La hipòxia indueix l'expressió de la FBLN5 en CE.....	147
4.2. L'eix PI3K/Akt/mTOR està implicat en la inducció de la FBLN5 per hipòxia	149
4.3. La inhibició de HIF-1 α reverteix la inducció de la FBLN5 per hipòxia	150

CONTINGUT

4.4. La hipòxia incrementa l'activitat transcripcional de FBLN5 a través d'un element de resposta a hipòxia (HRE).	153
4.5. HIF-1 α s'uneix al motiu HRE present en el promotor de FBLN5	156
4.6. HIF-1 α s'uneix al promotor de FBLN5	156
4.7. La inhibició de la FBLN5 potencia l'apoptosi induïda per hipòxia en CE.....	158
DISCUSSIÓ.....	165
CONCLUSIONS.....	181
BIBLIOGRAFIA	185
APÈNDIX 1: Medis, solucions i reactius.....	219
APÈNDIX 2: Publicacions.....	227

ABREVIATURES

ABREVIATURES

A2M	α 2-Macroglobulina
AAA	Aneurisma d'Aorta Abdominal
ADN	Àcid Desoxiribonucleic
ADNc	ADN complementari
AMPc	Monofosfat Cíclic d'Adenosina
AP-1	Proteïna Activadora 1
ARN	Àcid Ribonucleic
ARNc	ARN Complementari
ARNm	ARN Missatger
ARNr	ARN Ribosòmic
BAEC	Cèl·lules Endotelials d'Aorta Bovina
BAPN	β -aminopropionitril
BCA	Àcid Bicinconínic
bFGF	Factor de Creixement Bàsic de Fibroblasts (FGF-2, FGF- β)
BMP-1	Proteïna Morfogenètica Òssia-1
BNIP3	<i>Bcl-2 and nineteen-kilodalton interacting protein-37</i>
BSA	Albúmina Sèrica Bovina
cbEGF	Mòdul <i>Epidermal Growth Factor-like</i> d'unió a calci
CBP	Proteïna d'Unió a CREB
CDV	Cardiovascular
CE	Cèl·lules Endotelials
ChIP	Immunoprecipitació de Cromatina
CML	Cèl·lules Musculars Llises
CMLV	Cèl·lules Musculars Llises Vasculares
CMLVm	Cèl·lules Musculars Llises Vasculares Murines
DMOG	dimetiloxal·glicina
DMSO	dimetil sulfòxid
dNTP	desoxiribonucleòtids trifosfat
DPI	difeniliodoni
DRB	5,6-dicloro-1-(β -D-ribofuranosil) benzimidazol
DTT	ditiotreitòl
EDTA	àcid etilendiamintetraacètic
EGF	Factor de Creixement Epidèrmic
EGF-like	mòdul <i>Epidermal Growth Factor-like</i>
EGTA	àcid etilen glicol tetraacètic
EMSA	Assaig de Retard de la Mobilitat Electroforètica
EMT	Transició d'Epiteli a Mesènquima
EPO	Eritropoietina

ABREVIATURES

FACS	Selecció Cel·lular Activada per Fluorescència
FBLN	Fibulina
FBS	sèrum fetal boví
FC	<i>Fold Change</i>
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
FIH	Factor Inhibidor de HIF
FITC	isotiocianat de fluoresceïna
GFP	Proteïna Verda Fluorescent
HBSS	sol·lució salina balancejada de Hank
HC	homocisteïna
HIF	Factor de Transcripció Induïble per Hipòxia
HRE	Element de Resposta a Hipòxia
HUVEC	Cèl·lules Endotelials Humanes de Vena de Cordó Umbilical
i.p.	intraperitoneal
IFN- γ	Interferó γ
IGF-1	Factor de Creixement de tipus Insulina 1
IL	Interleucina
ILT	trombe intraluminal
LDL	Lipoproteïnes de Baixa Densitat
LDLR	receptor d'LDL
LOX	Lisil Oxidasa
LOXh	LOX humana
LOXL	LOX-like
LOX-PP	propèptid de LOX
LTBP	Proteïna d'Unió al TGF- β Latent
LTQ	Lisil Tirosil Quinona
MAPK	Proteïnes Cinasa Activades per Mitògens
MCP-1	Proteïna Quimiotàctica de Monòcits 1
MEC	Matriu Extracel·lular
MLEC	CE de Pulmó Murines
MMP	Metal·loproteases de Matriu
MOI	multiplicitat d'infecció
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
NO	òxid nítric
ODD	Domini de Degradació Dependent d'Oxigen
pb	parells de bases
PBS	solució salina tamponada amb fosfat
PCP	Procol·lagen C-proteinases

ABREVIATURES

PCR	Reacció en Cadena de la Polimerasa
PDGF	Factor de Creixement Derivat de Plaquetes
PDGF-B B	homodímer format per dues subunitats B de PDGF
PGE2	Prostaglandina E2
PHD	Prolil Hidroxilasa
PI	iodur de propidi
PI3K	Fosfoinositol 3 Cinasa
pVHL	proteïna von Hippel-Lindau
q.s.p.	quantitat suficient per
RE	Reticle Endoplàsmic
RIN	Nombre d'Integritat de l'ARN
ROS	Espècies Reactives d'Oxigen
RT-PCR	Retrotranscripció acoblada a la Reacció en Cadena de la Polimerasa
SDS	dodecil sulfat sòdic
SEM	Error Estàndard de la Mitjana
siRNA	ARN d'interferència
SOB	<i>Super Optimal Broth</i>
SOC	<i>Super Optimal broth with Catabolite repression</i>
SOD3	Superòxid Dismutasa Extracel·lular
TBP	TATA-binding protein
TE	Tampó Tris-EDTA
TFE3	<i>Transcription Factor Binding to IGHM Enhancer 3</i>
TGF- β	Factor de Creixement Transformant β
TGF β R	Receptor del TGF β
TIMP	Inhibidor Tissular de Metal·loproteases de Matriu
TNF- α	Factor de Necrosi Tumoral alfa
U.A.	Unitat d'Absorbància
VCAM-1	Molècula d'Adhesió Vascular 1
VEGF	Factor de Creixement de l'Endoteli Vascular

INTRODUCCIÓ

1. LA PATOLOGIA ATEROSCLERÒTICA

1.1. INTRODUCCIÓ

L'aterosclerosi és una patologia inflamatòria crònica que es caracteritza per la formació d'una placa d'ateroma (del grec *atheroma*, tumor ple de material pastós) a la paret arterial. En humans afecta principalment les artèries de mitjà i gran calibre i és la causa principal d'infarts de miocardi i malalties cerebrovasculars. Això fa que en les societats occidentals, l'aterosclerosi sigui el motiu sotsjacent al 50% de la mortalitat total [1]. De fet, les malalties cardiovasculars (CDV) són la causa principal de mortalitat i morbiditat en els països desenvolupats, i la seva importància és creixent en països en desenvolupament. L'Organització Mundial de la Salut estima en 17,3 milions les morts causades per malalties CDV arreu del món l'any 2008, i prediu que aquest nombre augmenti a 23,6 milions l'any 2030.

Aquestes dades ens alerten sobre la importància de mantenir una bona salut cardiovascular, i ens obliguen a reflexionar sobre quines són les causes d'aquestes patologies i què podem fer per prevenir-les, diagnosticar-les i tractar-les.

1.2. ESTRUCTURA DE L'ARTÈRIA

En una situació fisiològica normal, la paret arterial està formada per tres capes concèntriques ben diferenciades: l'adventícia, la *media* i l'íntima (Fig. 1).

La capa més externa és l'**adventícia**. Està formada principalment per matriu extracel·lular (MEC) i fibroblasts. Constitueix el suport per a les terminacions nervioses i els *vasa vasorum*, una xarxa finíssima de vasos que s'encarreguen d'aportar nutrients i oxigen a la paret arterial.

Separada de l'adventícia per la làmina elàstica externa trobem la **túnica media**. Aquesta capa és la que presenta un gruix més important i és l'encarregada de mantenir el to vascular. Està formada per cèl·lules musculars llises vasculares (CMLV), fibres elàstiques i fibres de col·lagen en proporció variable segons el tipus d'artèria.

A la cara més luminal, separada de la *media* per la làmina elàstica interna, trobem l'**íntima**. Aquesta està constituïda per una monocapa de cèl·lules endotelials (CE) i per la làmina basal de teixit fibroelàstic sobre la que reposen, denominada

INTRODUCCIÓ

subendoteli. La monocapa de CE o endoteli constitueix una barrera de permeabilitat selectiva entre les cèl·lules i components sanguinis i el teixit vascular, alhora que exerceix un paper actiu en la regulació de la homeòstasi vascular [2].

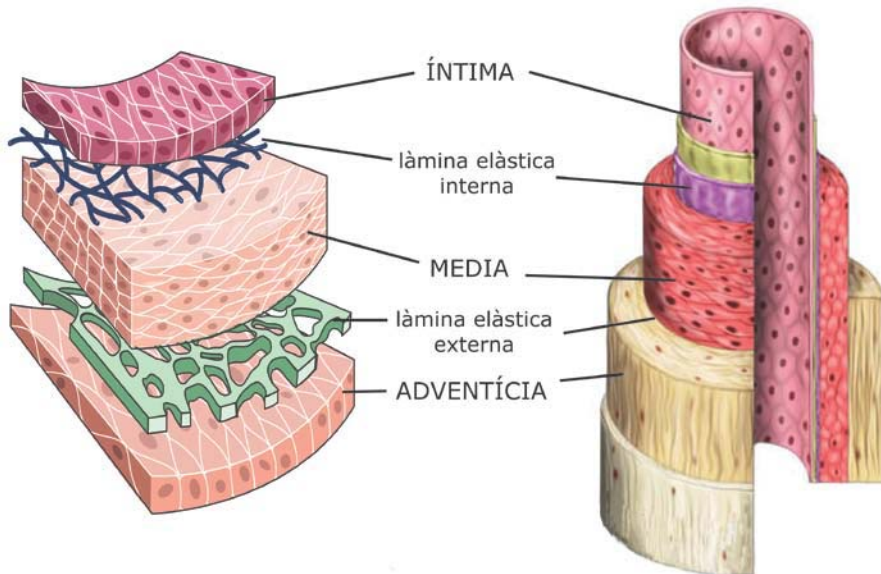


Figura 1. Estructura de les artèries. Representacions esquemàtiques mostrant les principals capes de les artèries (íntima, mèdia i adventícia) i les làmines elàstiques que les separen (làmines elàstiques interna i externa). Imatges adaptades de *SERVIER Medical Art* i *Medicalook.com*.

1.3. L'ENDOTELI VASCULAR

Tal i com hem comentat, l'endoteli no és simplement una barrera física, sinó que constitueix una barrera altament selectiva que regula el **pas de macromolècules** (p. ex. albúmina o lipoproteïnes) de la sang als teixits mitjançant un complex sistema microvesicular. A més a més, l'endoteli es considera un teixit multifuncional capaç de dirigir aspectes crítics de la fisiologia vascular [3]. Participa en el manteniment del **to vascular** mitjançant el balanç de producció de diverses substàncies. Per una banda, regula l'alliberació de substàncies vasoactives com l'òxid nítric (NO) i la prostaglandina I₂ (PGI₂), les quals actuen sinèrgicament induint la vasodilatació i inhibint l'agregació plaquetària; i per l'altra, de substàncies vasoconstrictores com l'endotelina i el tromboxà A₂ [4].

L'endoteli també regula l'**equilibri hemostàtic/trombòtic**. En condicions normals, l'endoteli té propietats antitrombòtiques mitjançant la secreció de molècules que inhibeixen l'agregació plaquetària com el NO, l'heparina, la trombomodulina, el factor activador del plasminogen o la prostaciclina. No obstant, l'endoteli també pot contribuir a l'hemostàsia en sintetitzar factors proagregants de plaquetes com el factor de von Willebrand (vWF), la fibronectina, la trombospondina i factors pro-coagulants com el factor V i el factor tissular, desencadenant la cascada de coagulació. Així mateix, l'endoteli genera substàncies inhibidores de la fibrinòlisi com l'inhibidor 1 de l'activador del plasminogen (PAI-1).

Finalment, l'endoteli també té **propietats antiadherents per a leucòcits**, ja que, en condicions basals, els nivells d'expressió dels gens que codifiquen per a proteïnes d'adhesió com la molècula d'adhesió vascular 1 (VCAM-1) o la E-selectina són mínims.

1.4. LA LESIÓ ATEROSCLERÒTICA

L'aterosclerosi és una malaltia inflamatòria crònica que provoca una alteració de l'estructura de les artèries, engruixint-les i endurent-les. Afecta principalment a les artèries de mitjà i gran calibre, tot i que això varia amb l'edat: en humans, és normal que la formació de plaques ateroscleròtiques a l'aorta s'iniciï durant la primera dècada de vida, a les artèries coronàries a la segona dècada i a les artèries cerebrals a la tercera o quarta dècada. Aquestes lesions asimptomàtiques, considerades com estadis inflamatoris crònics, poden evolucionar amb l'edat fins a lesions altament inestables. Aquestes darreres poden donar lloc a episodis clínics aguts com accidents cerebrovasculars o infarts de miocardi, promoguts en la majoria dels casos per la ruptura de la placa i la consegüent trombosi [1].

1.4.1. Hipòtesi de la resposta a la lesió

Tot i que la patologia ateroscleròtica és un fenomen conegut des de l'antiguitat clàssica (si bé probablement no se'n relacionaven els accidents CDV que se'n derivaven), les primeres teories que tracten d'explicar-ne el seu origen no apareixen fins al segle XIX. Carl von Rokitansky formulà el 1852 la **teoria trombogènica** o de la incrustació [5], en la que suggeria que l'engruiximent de l'íntima és degut a la deposició de fibrina i a la seva posterior organització

INTRODUCCIÓ

mitjançant fibroblasts, previ a una deposició lipídica. El 1904, Felix Jacob Marchand donà nom a la patologia, utilitzant els mots grecs *athero* (pasta) i *skleros* (pedra) [6]. L'entrada al segle XX del terme aterosclerosi va anar acompanyada d'una nova teoria, la **lipídica**, formulada per Nikolai Anitschkov i Sergei Chalotov el 1913, que consideraven que l'acumulació de colesterol a les artèries és la causa principal de formació de lesió ateroscleròtica [7].

Aquestes teories basades principalment en l'acumulació passiva de fibrina, lípids o colesterol, es capgiraren el 1973 quan R. L. Wissler va donar a la paret arterial un paper actiu en el desenvolupament de l'aterosclerosi en destacar-ne la migració i proliferació de CMLV. Les seves observacions en humans i animals d'experimentació, juntament amb les realitzades per M. D. Haust [8], suggerien que la proliferació de CMLV era una resposta enfront a un dany a la paret vascular. Les cèl·lules de la paret malmeses desencadenarien una resposta inflamatòria crònica que aniria seguida d'una resposta fibroproliferativa. Seguint aquesta línia, R. Ross formulà a la dècada dels 90 la teoria més acceptada avui dia, la de la **resposta a la lesió**. Aquesta defineix l'aterosclerosi com una malaltia inflamatòria fibroproliferativa crònica originada per un dany a l'endoteli [9]. Aquesta alteració de l'endoteli o **disfunció endotelial** desencadenaria una sèrie de mecanismes que conduirien a la infiltració de cèl·lules com monòcits o limfòcits T a l'espai sub-endotelial, a la proliferació i migració de CMLV i a la deposició de material lipídic, calci i matriu extracel·lular [10].

Avui dia està ben establert que els principals factors de risc ateroscleròtic són la hipercolesterolèmia, la hipertensió, la diabetis mellitus, el tabaquisme, les alteracions genètiques, els nivells d'homocisteïna elevats o la infecció per microorganismes com *Chlamydia pneumoniae* o *Herpes virus*. És per això que l'aterosclerosi es considera una malaltia multifactorial, fet que malauradament complica el seu estudi, prevenció i tractament.

1.4.2. Evolució de la lesió

1.4.2.1. Lesió inicial: disfunció endotelial

Les alteracions de les CE que afecten o comprometen el seu funcionament normal donen lloc al que coneixem com a **disfunció endotelial**, i desencadenen una sèrie d'esdeveniments que promouen la formació de lesions ateroscleròtiques. En respondre a un dany provocat per estímuls proaterogènics, l'endoteli pateix un

desequilibri en les seves funcions que es reflexa en un canvi profund en el seu patró d'expressió gènica. Un dels majors canvis responsables de la disfunció endotelial és la disminució de la biodisponibilitat de NO, derivada en part de la inhibició de l'enzim responsable de la seva síntesi, l'òxid nítric sintasa endotelial (eNOS) [4, 11].

L'anatomia de les artèries també influeix en el funcionament de l'endoteli. En les regions tubulars, on el flux sanguini és laminar, les CE són el·lipsoïdes i es troben alineades amb la direcció del flux. No obstant, en les curvatures o bifurcacions, on el flux sanguini és interromput o canvia de direcció, les CE són poligonals i no tenen una orientació determinada. En aquests punts l'endoteli presenta una major permeabilitat a macromolècules com les lipoproteïnes de baixa densitat (LDL), i les possibilitats d'iniciar-s'hi una lesió són més elevades [12]. En interaccionar amb els components de la matriu extracel·lular, principalment els proteoglicans, les LDL queden parcialment immobilitzades [13], fet que afavoreix que pateixin alteracions químiques com oxidació o glicosilació. També s'ha descrit que la hipercolesterolèmia augmenta la permeabilitat endotelial, fet que afavoreix encara més la internalització de lípids a l'espai subendotelial [14]. En aquestes zones d'estrès hemodinàmic, a més, augmenta l'expressió de molècules d'adhesió com la P-selectina i l'E-selectina, la Molècula d'Adhesió Intercel·lular 1 (ICAM-1) i VCAM-1, les quals afavoreixen la infiltració de leucòcits a l'espai subendotelial [15-17]. Per tant, la disfunció endotelial afavoreix l'aparició de zones d'inflamació a la paret arterial.

1.4.2.2. Inflamació

El procés ateroscleròtic s'acompanya d'un estat inflamatori crònic. En resposta a la infiltració d'LDL, les CE i les CMLV alliberen **molècules quimioattractants** com la Proteïna Quimiotàctica de Monòcits 1 (MCP-1) o la interleucina-8 (IL-8), afavorint encara més el reclutament de cèl·lules inflamatòries [18]. Un cop a l'espai subendotelial, els monòcits poden diferenciar-se a macròfags, activats per citocines com el Factor Estimulant de Colònies de Macròfags (M-CSF), el qual és secretat pels limfòcits T o les mateixes CE en resposta a les LDL oxidades [19, 20]. Els macròfags presenten antígens que activen els limfòcits T, els quals responen amb l'alliberació d'interferó γ (IFN- γ). Aquesta citocina, al seu torn, activa els macròfags i altres tipus cel·lulars, com les CMLV, promovent que secretin altres **citocines proinflamatòries** com el TNF- α (Factor de Necrosi Tumoral α) o la IL-1, amplificant així el procés inflamatori [18, 21, 22].

INTRODUCCIÓ

Els macròfags i les CE produeixen **espècies reactives d'oxigen (ROS)** i enzims del tipus mieloperoxidases, esfingomielinases i fosfolipases, tots els quals contribueixen encara més a la modificació de les LDL de tal manera que poden ser captades per macròfags gràcies als seus Receptors *Scavenger* (SR), com l'SR-A o el CD36 [23]. D'aquesta manera, els macròfags acumulen grans quantitats d'èsters de colesterol, els quals provoquen els canvis fenotípics pels quals reben el nom de **cèl·lules escumoses**. Al seu torn, les cèl·lules escumoses produeixen ROS i factors de creixement, els quals fan augmentar la inflamació local i la resposta proaterogènica [24]. Els agents quimioatracients, principalment el factor de creixement derivat de plaquetes (PDGF), estimulen la migració de CMLV de la túnica mitjana cap a l'espai subendotelial. Aquest procés es veu afavorit per un augment dels nivells de metal·loproteases de matriu (MMP) per part de CE i CMLV promogut pel mateix PDGF i també per d'altres agents mitògens, com el factor de creixement bàsic de fibroblasts (bFGF), el factor de creixement epidèrmic (EGF), la trombina o l'angiotensina II [25]. Les CMLV proliferen donant lloc a una nova capa a la paret arterial, que es coneix com a **neointima**.

Tot aquests processos provoquen l'engruiximent de la paret arterial, provocant una estenosi luminal [26, 27]. La lesió es pot apreciar a simple vista i es denomina **estria grassa**. La majoria d'individus dels països desenvolupats arriben a aquest estadi a edats molt primerenques (infància i adolescència) [9].

1.4.2.3. Lesió avançada i trombosi

La major part de l'engruiximent propi de les plaques ateroscleròtiques avançades es deu a l'acumulació de MEC més que no pas de cèl·lules. Hi trobem col·làgens intersticials (tipus I i III), proteoglicans i fins i tot fibres elàstiques. Això es deu al fet que les CMLV, que han canviat el seu fenotip contràctil per un de sintètic, produeixen proteïnes de MEC de manera similar a com ho farien durant el desenvolupament embrionari. Els factors de creixement també intervien en aquest procés, com el PDGF o el factor de creixement transformant β 1 (TGF- β 1), els quals promouen una síntesi de col·lagen excessiva per part de les CMLV. L'acumulació creixent de cèl·lules i matriu, així com de lípids, pot acabar formant una **coberta fibrosa** [9, 28, 29], la qual cobreix el que es coneix com a **nucli lipídic o necròtic**, en el qual trobem restes de cèl·lules escumoses que, ja sigui per l'efecte tòxic de la càrrega lipídica com per les citocines proapoptòtiques i elements oxidatius presents en aquest microambient, moren per processos apoptòtics o necròtics [30].

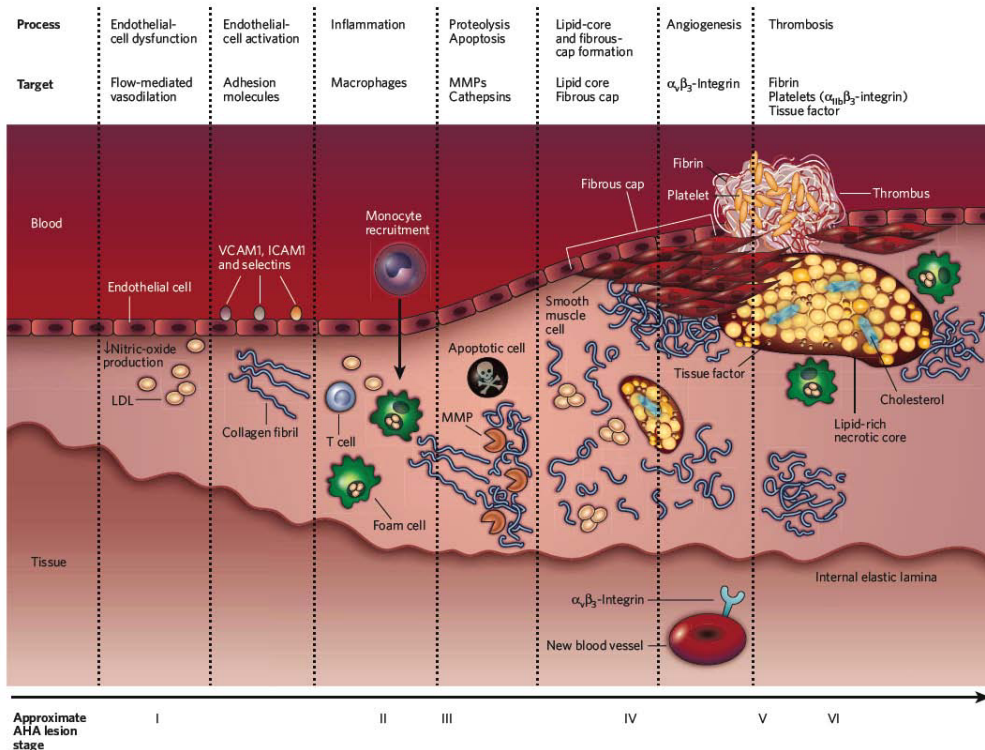


Figura 2. Evolució de la lesió ateroscleròtica. Esquema mostrant de manera simplificada el desenvolupament de la lesió ateroscleròtica. AHA, American Heart Association; ICAM1, molècula d'adhesió intercel·lular 1; LDL, lipoproteïna de baixa densitat; MMP, metal·loproteasa de matriu; VCAM1, molècula d'adhesió de cèl·lula vascular 1. Imatge extreta de Sanz *et al.*(2008) [31].

L'engruïment de la placa ateroscleròtica, juntament amb l'elevada taxa de consum d'oxigen de les cèl·lules escumoses, provoca l'aparició de regions d'**hipòxia** en les àrees més internes de la placa [32-34]. De fet, les zones hipòxiques de lesions ateroscleròtiques carotídi es caracteritzen típicament per presentar nivells elevats del Factor de Transcripció Induïble per Hipòxia 1 α (HIF-1 α), del qual en parlarem més endavant. En les plaques avançades s'hi donen fenòmens d'**angiogènesi**, procés pel qual es formen nous vasos sanguinis a partir de vasos preexistents. L'angiogènesi s'ha correlacionat amb la hipòxia intraplaca [34], fet que pot interpretar-se com una resposta adaptativa encarada a restaurar el subministrament d'oxigen als teixits [35]. No obstant, el més freqüent és que els neovasos formats no acabin de ser funcionals, amb parets febles, fuites i vasos cecs, fet que contribueix a la inestabilització de la lesió [36]. Durant l'evolució de la lesió, les plaques ateroscleròtiques poden complicar-se en patir **hemorràgies**

INTRODUCCIÓ

provocades per la ruptura de neovasos i fenòmens de **calcificació**. Aquest últim és un fenomen tardà en la progressió de la lesió ateroscleròtica [37, 38].

Finalment, les lesions ateroscleròtiques avançades poden donar lloc a **plaques estables**, que evolucionen reduint la llum del vas, provocant per exemple l'angina de pit estable [39]. Però també poden donar lloc a **plaques inestables o vulnerables**, caracteritzades per tenir una fina coberta fibrosa degut a una reducció del contingut en elastina i col·lagen, a una gran activitat de MMP i a la presència d'un nucli lipídic inflamatori i necròtic important [40-43]. Aquestes plaques poden trencar-se o erosionar-se, provocant la formació d'un trombe, el qual pot ocasionar un episodi clínic agut, com l'infart de miocardi o l'íctus [10, 44, 45]. Les plaques inestables, per tant, són les que originen els episodis clínics més greus derivats de l'aterosclerosi.

2. L'ANEURISMA D'AORTA ABDOMINAL (AAA)

2.1. EPIDEMIOLOGIA I FACTORS DE RISC

L'aneurisma és una patologia vascular que consisteix en la dilatació permanent i localitzada dels vasos sanguinis deguda a un afebliment de la paret vascular. Ocorre principalment en artèries, especialment en l'aorta abdominal infrarenal, donant lloc a l'**aneurisma d'aorta abdominal (AAA)** (Fig. 3). Aquesta patologia té una prevalença de fins al 8% en homes de més de 65 anys, i s'estima que és la desena causa de mort més comú, essent responsable d'un ~2% de totes les morts. Els principals factors de risc de l'AAA són el tabaquisme i l'edat. De fet, en les societats occidentals, la incidència d'AAA es troba augmentada degut a l'envelliment de la població [46-48]. La patologia aneurismàtica també pot provocar altres complicacions secundàries, tot i que menys habituals, com per exemple l'embolització distal, les fístules aortoentèriques o aortocaves i la compressió de venes ilíaqües, la qual resulta en trombosi venosa profunda.



Figura 3. Aneurisma d'aorta abdominal. Reconstrucció tridimensional d'un angiograma CT mostrant un gran aneurisma d'aorta abdominal al qual s'hi troba associat a un altre aneurisma a l'artèria ilíaca dreta. Aquest angiograma correspon a un home de 76 anys asimptomàtic, previ a una intervenció de reparació endovascular. Imatge obtinguda de Nordon *et al.* (2011) [61].

En l'AAA, la paret arterial s'afebleix i l'aorta es dilata progressivament fins al punt que, si no s'intervé, pot arribar a trencar-se [49]. Normalment es considera que hi ha AAA quan el diàmetre aòrtic màxim és de ≥ 3 cm (el que suposa un 50% més del diàmetre normal) [50], tot i que existeixen diversos criteris per definir l'AAA [51, 52]. Avui en dia el diàmetre de l'artèria és l'únic indicador del risc de ruptura (>5 cm), i l'única teràpia que s'hi aplica és la cirurgia, molt costosa per a la sanitat pública i amb un elevat índex de morbiditat i mortalitat [53]. A més a més, no es disposa d'eines farmacològiques que limitin la progressió o promoguin la regressió dels AAA ja establerts [54].

Tal i com hem indicat, existeixen diversos factors de risc que afecten alguna de les etapes de l'AAA (desenvolupament, expansió i ruptura), però l'únic factor de risc que s'associa amb totes tres etapes de manera irrefutable és el **tabaquisme** [46, 55]. El manteniment de l'hàbit incrementa l'expansió i risc de ruptura de l'AAA i n'empitjora la prognosi, i hi ha evidències que el risc disminueix en deixar de fumar [56].

Tradicionalment, s'ha considerat l'**aterosclerosi** com un dels factors que sotsjauen a la dilatació de l'aorta [57, 58]. La presència de lesions ateroscleròtiques en el teixit aneurismàtic és freqüent, i ambdues patologies comparteixen alguns dels seus factors de risc [46, 59, 60]. Tot i això, la possible implicació de l'aterosclerosi en els AAA és encara avui tema de debat. De fet, no s'ha trobat cap associació entre els **nivells lipídics** plasmàtics i l'AAA, si bé s'ha observat un efecte protector de nivells elevats d'HDL (lipoproteïnes d'alta densitat), aquest pot interpretar-se simplement com a símptoma d'un bon estat de salut CDV [61].

INTRODUCCIÓ

Pel que fa a la **hipertensió**, s'ha establert com a factor de risc de ruptura d'AAA, no obstant, només s'ha pogut associar clarament amb el risc de desenvolupar AAA en dones [62-65].

Altres factors de risc inclouen l'**obesitat**, que s'associa independentment amb l'AAA, i l'**alcoholisme** [66-68]. No s'ha establert el mecanisme pel qual el consum d'alcohol augmenta el risc de patir AAA, però hi ha indicis que sigui mitjançant la inducció de metal·loproteases i de la degradació focal d'elastina [61]. Pel que fa a la **diabetis**, cal destacar que tot i ser un factor de risc per a l'aterosclerosi, resulta protectora contra el desenvolupament i expansió de l'AAA [52, 69]. Es desconeix per quins mecanismes la diabetis pot exercir aquest paper, tot i que s'ha proposat que la hiperinsulinèmia, la hiperglicèmia o fins i tot els agents terapèutics usats en aquesta patologia podrien estar-hi involucrats. Aquests fàrmacs tenen la capacitat d'estabilitzar el trombe mural, augmentar la duresa de la paret aòrtica, i disminuir la inflamació sistèmica [70-72].

Diversos estudis familiars i de bessons han evidenciat la importància de la **predisposició genètica** a patir AAA [73, 74]. La probabilitat que el bessó monozigòtic d'una persona amb AAA desenvolupi un aneurisma és del 24% [75]. Sembla que la importància del rerefons genètic rau principalment en l'acumulació de gens susceptibles (principalment aquells que regulen mediadors inflamatoris, proteases o la biologia de les CMLV), més que no pas en el fet de tenir una única mutació puntual.

Recentment s'ha proposat que la predisposició a desenvolupar AAA podria tenir un **origen embrionari** [61]. La síntesi d'elastina a l'aorta abdominal s'atura pràcticament al naixement, de manera que qualsevol anomalia en l'elastogènesi fetal podria tenir efectes a llarg terme. Tanmateix, les vies de senyalització que actuen durant l'embriogènesi determinen el fenotip de les CMLV i de les seves futures respostes a factors implicats en la patologia de l'AAA, com ara el TGF- β 1 [76].

Finalment, cal destacar que hi ha cada cop més indicis que fan pensar en els AAA com una mostra local d'una malaltia vascular sistèmica [77]. De fet, els pacients amb patologia aneurismàtica poden presentar anomalies en altres punts de la vasculatura [78].

2.2. FORMACIÓ DE L'AAA

La patologia aneurismàtica a l'aorta abdominal es presenta com un procés fisiopatològic complicat i dinàmic, que culmina en un remodelat irreversible del teixit connectiu [79]. Els principals processos que donen lloc al fenotip de l'AAA són tres: proteòlisi, inflamació i apoptosi de CMLV, els quals comporten que la paret arterial pateixi una **pèrdua de l'elasticitat i resiliència**, impeding la recuperació del diàmetre arterial normal després de cada pulsació. Tot i que la tendència a la dilatació arterial sigui sistèmica, aquest fenomen és més evident a l'aorta [80]. Per la seva situació, l'aorta abdominal està exposada a **forces hemodinàmiques** úniques. Té a prop la primera gran ramificació de l'aorta (l'artèria celíaca), i comprèn el recorregut des de les artèries renals fins a bifurcar-se en les ilíaqes. L'ona de pressió sanguínia augmenta a mesura que es propaga des de la creua aòrtica fins a la bifurcació, com a conseqüència de la disminució del diàmetre de l'aorta [81]. Si en aquest punt ja és normal una lleugera escassetat d'elastina i col·lagen [82], la disminució d'aquests components de MEC associada a l'edat fa que l'aorta abdominal sigui especialment vulnerable a l'estrès mecànic repetitiu [83].

L'AAA s'inicia amb un procés de **degradació de teixit connectiu**, principalment de fibres d'elastina, per part de MMP i probablement també d'altres enzims, com la plasmina, les serina elastases i la catepsina [84-87]. D'aquesta manera, la media perd la seva estructura laminar i les seves propietats elàstiques, provocant la dilatació arterial.

La paret arterial pateix, a més a més, una **infiltració inflamatòria** excessiva, consistent en limfòcits T i B i macròfags. Tot i que es desconeix per quin motiu s'inicia el procés inflamatori, és probable que els pèptids solubles derivats de la degradació de components de la MEC, incloent-hi l'elastina, la laminina i la fibronectina, actuïn com a agents quimiotàctics promovent la infiltració de macròfags [88]. Tampoc no està ben establert com es recluten els leucòcits, però probablement aquest procés estigui dirigit pels elevats nivells de IL-8, MCP-1 i RANTES que trobem en l'AAA [89, 90]. Tanmateix, els teixits aneurismàtics produeixen una gran quantitat de prostaglandina E₂ (PGE₂), TNF- α , IL-1 β i IL-6. Aquestes citocines poden induir l'expressió i l'activació de MMP i d'inhibidors tissulars de MMP (TIMP) [89, 91-95].

INTRODUCCIÓ

L'afebliment de la paret arterial empitjora amb una important reducció del contingut de CMLV, les quals moren per **apoptosi** [96, 97]. Com a efecte compensatori, hi ha una gran **deposició de col·lagen** [98], el contingut del qual augmenta amb la mida de l'AAA [99, 100]. Hi trobem principalment col·lagen dels tipus I i III, essent aquest darrer el principal responsable de les característiques tensores d'aquesta nova matriu [101, 102].

La desestructuració de la capa media fa que l'**adventícia** hagi de suportar unes forces centrífugues inusuals, a les quals respon generant respostes immunes inflammatòries, fibròtiques i angiogèniques [103, 104], complicant encara més el desenvolupament de l'aneurisma. S'ha observat una forta correlació espacial entre els neocapilars, la degradació de fibres elàstiques i la mida de l'infiltrat de leucòcits a la cara externa de la paret arterial dels AAA [105].

Tots aquests canvis provoquen l'augment gradual del diàmetre aòrtic i de l'estrès hemodinàmic, així com la transferència de la força tensora de la paret arterial a les fibres de col·lagen [106-111]. La majoria d'aneurismes són asimptomàtics fins al moment de la **ruptura**. El risc d'arribar a aquest punt augmenta paral·lelament amb el diàmetre aòrtic [112]. És molt probable que la ruptura vagi precedida de la degradació proteolítica de les fibres de col·lagen [83]. De fet, la zona de ruptura es caracteritza per tenir una elevada expressió de proteases, així com un elevat nombre de leucòcits i neovascularització focal [113, 114].

En els darrers anys s'està prestant molta atenció al **trombe intraluminal (ILT)**, que trobem en el 75% dels AAA [115]. L'ILT és un neoteixit biològicament actiu format per múltiples capes de fibrina coagulada. La cara luminal de l'ILT està formada per una capa hemàtica fresca amb fibres de fibrina, mentre que a la cara abluminal hi trobem fibrinòlisi activa. El gruix d'aquest trombe fa disminuir la **biodisponibilitat d'oxigen** a la paret arterial [116], fet que podria estar incrementant la bioreactivitat dels macròfags i la seva producció d'elastasa [117]. La presència d'ILT s'ha associat a parets arterials més primes, major elastòlisi, menor densitat de CMLV a la media, i un nivell més elevat de resposta immune inflammatòria a l'adventícia [116, 118].

Avui dia, l'única estratègia que s'aplica per reduir el risc de ruptura és la intervenció quirúrgica. Degut a l'absència d'eines farmacològiques per tractar l'AAA, la millora del nostre coneixement sobre els mecanismes implicats en la formació i la progressió dels AAA és fonamental per tal de desenvolupar estratègies que previnguin o frenin l'expansió d'aquesta patologia.

3. LA HIPÒXIA

3.1. INTRODUCCIÓ

Tal i com hem comentat anteriorment, la progressió de la lesió ateroscleròtica suposa un engruïment de la paret vascular que pot generar regions d'hipòxia. Com veurem, la hipòxia és un estímul important en situacions fisiològiques normals, però també en situacions patològiques.

La hipòxia en els teixits ocorre quan la pressió d'oxigen baixa per sota del nivell normal (21%), i es pot donar de manera transitòria o crònica. La **hipòxia transitòria** pot tenir un significat fisiològic, com p. ex. en l'exercici o durant el desenvolupament embrionari [119-123], o patològic, com en la sèpsia o en teixits traumatitzats. La hipòxia crònica pot ser contínua o intermitent. La **hipòxia crònica contínua** tant pot succeir en situacions fisiològiques, com les que es donen quan la pressió de O₂ és baixa per causa de l'alçada, com en patològiques, com en teixits mal oxigenats. En canvi, la **hipòxia crònica intermitent**, ocasionada per episodis breus d'hipòxia i reoxigenació (com en les apnees), només ocorre en un context patològic [124]. La hipòxia, per tant, és un estímul fisiològic essencial que també està involucrat en diversos processos patològics com la hipertensió pulmonar, malalties CDV i tumorigènesi [125].

Degut a la importància que té l'oxigen en la producció d'energia, els organismes aeròbics han desenvolupat una sèrie de respostes per tal de compensar la davallada dels nivells d'oxigen que té lloc en condicions d'hipòxia. En els mamífers, aquestes respostes estan destinades a restablir el subministrament de nutrients i oxigen a les zones afectades, promovent un increment en l'ús de glucosa, l'eritropoesi o l'angiogènesi, entre d'altres [126-129]. Les respostes a la hipòxia impliquen un canvi en l'expressió gènica que afecta aproximadament un 2% del transcriptoma [130]; aquests canvis estan promoguts per l'activació de diferents factors de transcripció, però principalment dels **Factors de Transcripció Induïbles per Hipòxia (HIF)** [128, 131, 132].

INTRODUCCIÓ

3.2. ELS FACTORS DE TRANSCRIPCIÓ INDUÏBLES PER HIPÒXIA (HIF)

Les proteïnes HIF pertanyen a la família de factors de transcripció bHLH-PAS (*basic helix-loop-helix-Per/ARNT/Sim*). Aquests estan formats per una subunitat comú β (HIF- β o ARNT1) i per una subunitat α , que en humans presenta tres isoformes: HIF-1 α , HIF-2 α (o EPAS, *d'endothelial Per-ARNT-Sim domain protein*) i HIF-3 α [133-135]. Mentre que els nivells de HIF- β es mantenen estables, les subunitats α presenten una fina regulació dependent d'oxigen. HIF-1 α és el factor expressat de manera més ubiqüa i el més caracteritzat de la família; se'l considera el principal regulador de la resposta a hipòxia [136]. HIF-2 α també està implicat en aquesta resposta, no obstant, la seva expressió està restringida a certs tipus cel·lulars [134, 137]. Per tant, si bé sembla que aquests dos factors puguin tenir papers redundants, en tenir patrons d'expressió diferents, podrien controlar processos fisiològics diferents. HIF-3 α , el factor menys caracteritzat de la família, sembla que podria actuar com a repressor intern del sistema HIF [138]. La majoria de les respostes que comentarem a continuació fan referència a HIF-1 α .

Els factors HIF activen els seus gens diana unint-se als **elements de resposta a hipòxia (HRE)** presents en els seus promotors. Aquestes seqüències, composades per uns 18 parells de bases, es caracteritzen per tenir una seqüència central 5'-RCGTG-3' [139, 140]. La unió dels factors HIF als seus elements de resposta induïx l'expressió de gens associats amb la supervivència cel·lular, el metabolisme anaeròbic, la vascularització, el transport de nutrients i la migració cel·lular [136]. Així, com a gens diana de HIF trobem gens que fan incrementar la glicòlisi, com la lactat deshidrogenasa-A o la piruvat deshidrogenasa cinasa; gens que regulen el to vascular com l'endotelina; o gens que controlen el transport i biodisponibilitat d'oxigen com l'eritropoetina. També hi trobem factors mitogènics com el PDGF o el bFGF; factors angiogènics com el VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) i els seus receptors; factors apoptòtics com el BNIP3, la p53 o l'annexina-V; proteïnes que afecten la mobilitat i el contacte cel·lular com Notch o l'Angiopietina-2; o proteïnes del metabolisme de la MEC com la LOX, la MMP-2, la MMP de membrana MT1 o els seus reguladors TIMP-1 [141, 142].

3.2.1. La regulació de HIF

Pràcticament totes les cèl·lules de l'organisme són sensibles a canvis en la pressió d'oxigen i són capaces de generar una resposta transcripcional dirigida per HIF [143, 144]. Tot i que les dues subunitats de HIF, α i β , s'expressen constitutivament, la vida mitja de les primeres es veu finament regulada pels nivells d'oxigen, principalment a través de **mecanismes postranscripcionals**.

Les subunitats α presenten un **domini de degradació dependent d'oxigen (ODD)** format per dos residus de prolina, que en condicions de normòxia són hidroxilats per les **prolil hidroxilases 1, 2 i 3 (PHD1-3)**, una família de dioxigenases dependents de 2-oxoglutarat [145-148]. Aquesta modificació permet la interacció de HIF- α amb la proteïna von Hippel-Lindau (pVHL), que és una subunitat del complex E3 ubiquitina ligasa [149, 150]. Aquesta interacció facilita la ubiquitinització de HIF- α i, per tant, el condueix a ser degradat per via proteosòmica [145, 146, 151-154]. Aquesta regulació fa que, en presència d'oxigen, la vida mitja de HIF- α sigui de no gaire més de 5 minuts. Les subunitats α presenten un segon ODD regulat de manera similar en hidroxilar-se per l'asparagina hidroxilasa **FIH (Factor Inhibidor de HIF)** [155]. Les PHD1-3 requereixen O_2 (a més a més de ferro $[Fe^{2+}]$, 2-oxoglutarat i ascorbat) per poder hidroxilar els residus de prolina [141, 156]. La hidroxilació per part de FIH també és dependent de O_2 . Per tant, en condicions d'hipòxia, l'activitat d'aquests enzims queda inhibida i, en conseqüència, es redueix notablement la degradació dels factors HIF- α al citoplasma (Fig. 4) [157, 158]. Els agents quelants de ferro, el cobalt (capaç d'unir-se al grup hemo de les PHD), o la dimetiloxaliglicina (DMOG, que competeix amb el 2-oxoglutarat per unir-se a les PHD), limiten l'activitat de les PHD, eviten la hidroxilació de HIF- α i mimetitzen l'efecte estabilitzador de HIF provocat per la hipòxia [159]. Tot i que encara no està ben caracteritzat, també hem de tenir en compte la participació de les **proteïnes d'estrès**, que en unir-se a HIF-1 el protegeixen de la degradació [160].

La consegüent acumulació de subunitats α fa que aquestes entrin al nucli, on formen heterodímers amb les subunitats HIF- β , els quals poden unir-se als **HRE** presents en els promotors de molts dels gens involucrats en la resposta a la hipòxia. Però per això, els cal **transactivar-se** mitjançant la unió al seu coactivador **CBP/p300** [161-163]. En condicions de normòxia, la hidroxilació del residu d'asparagina d'un dels ODD per part de la FIH suposa un impediment estèric en la unió amb el coactivador, de manera que HIF-1 no es pot transactivar. En canvi, en

INTRODUCCIÓ

absència d'oxigen, HIF-1 α és fosforilat i translocat al nucli, on dimeritza amb HIF- β i s'acobla a CBP/p300, permetent la inducció de l'expressió gènica (Fig. 4) [164].

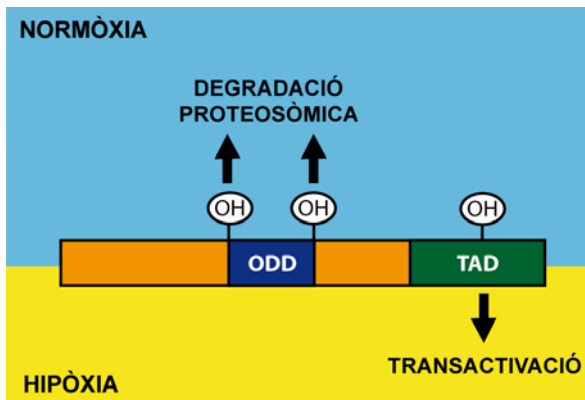


Figura 4. Representació esquemàtica de la regulació de HIF-1 α segons els nivells d'oxigen. ODD, domini de degradació dependent d'oxigen; TAD, domini de transactivació.

A més a més de tots aquests mecanismes de regulació, HIF-1 també pot ser activat a **nivell transcripcional** per **estímuls independents de la pressió de O₂**. En condicions de normòxia, moltes citocines i factors de creixement activadors de receptors del tipus tirosina cinasa (RTK) augmenten la transcripció de HIF-1 α . Entre aquests factors trobem la insulina, la IL-1 β , el TNF- α , l'EGF, la trombina, o l'endotelina 1, entre d'altres [165-168]. Aquest factors s'uneixen a receptors tirosina cinases i receptors acoblats a proteïnes G, i activen vies de senyalització que inclouen PI3K, Akt (PKB), Ras, MAPK i MEK, essent la via més important l'**eix PI3K/Akt/mTOR** [167, 169, 170]. Aquestes vies fan augmentar la transcripció de HIF-1 α i estimulen la supervivència cel·lular, el creixement i la proliferació. Per exemple, en situacions de normòxia, tant l'angiotensina II, necessària per a la vasculogènesi, com la trombopoetina, necessària per al manteniment de les cèl·lules mare hematopoètiques, estableixen HIF-1. Ara bé, s'ha observat que aquesta estabilització requereix la presència de **ROS** [171, 172].

En els últims anys s'ha posat de manifest la importància de les ROS com a desencadenants de l'estabilització de HIF-1 α . Els nivells fluctuants de O₂ que es donen en situacions d'**hipòxia intermitent** inhibeixen parcialment el transport mitocondrial d'electrons, produint canvis en l'estat redox dels transportadors d'electrons que fan incrementar la **producció mitocondrial de ROS**. Aquests agents oxidants entren al citosol i funcionen com a missatgers secundaris en la via de senyalització que mena a l'estabilització de HIF-1 α . Segons aquest model, les ROS estabilitzarien HIF- α en inhibir indirectament l'activitat hidroxilasa, bloquejant la degradació proteosòmica de HIF (Fig. 5) [173-178]. A més a més, la hipòxia

intermitent pot incrementar la síntesi de HIF-1 α i la seva transactivació al nucli: els nivells fluctuants d'oxigen promouen la producció de ROS per part de la **NADPH oxidasa**, i aquestes ROS indueixen l'activitat de la fosfolipasa C γ generant inositol-3-fosfat (IP3) i diacilglicerol (DAG). Aquests, al seu torn, inicien dues cascades de senyalització: l'una indueix PKC, la qual estimula la síntesi de HIF-1 α dependent de **mTOR**, i l'altra, mitjançant la immobilització de Ca²⁺ intracel·lular, fosforila CBP/p300, promovent la seva interacció amb HIF-1 α (Fig. 5). D'aquesta manera, l'activació persistent de mTOR evita que els nivells de HIF-1 α caiguin dràsticament durant els períodes de reoxigenació, tal i com succeiria després de situacions d'hipòxia contínua [179, 180].

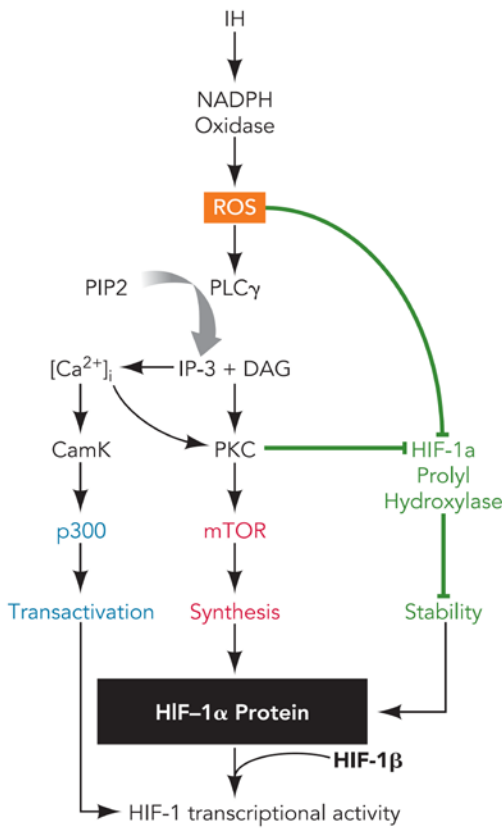


Figura 5. Vies de senyalització implicades en la inducció de HIF-1 α per hipòxia intermitent (HI). Imatge extreta de Semenza *et al.* (2009) [124].

Finalment, cal esmentar que les múltiples respostes induïdes per la hipòxia poden estar modulades per altres factors de transcripció, com AP-1, SP1 o proteïnes Smad, les quals també s'associen a CBP/p300 [181-185]. De fet, els **Smad** estan involucrats en la inducció de diversos gens en resposta a la hipòxia, com ara l'endoglina, el TGF- β 2 o l'eritropoetina. El paper dels Smad en aquests casos és promoure la formació de complexes entre diferents coactivadors permetent així la

INTRODUCCIÓ

transactivació [183, 186-188]. Si bé alguns Smad poden unir-se directament a elements de resposta (SBE), per tal que aquesta unió pugui regular la transcripció, també els cal associar-se a altres factors de transcripció, com AP-1, TFE3 o FoxG1 [189]. Finalment, cal destacar que a més d'estar involucrats en l'activació de gens de resposta a la hipòxia, els Smad participen en la regulació de la síntesi de MEC, principalment vehiculant les respostes promogudes pel TGF- β 1 [190].

4. LA LISIL OXIDASA

4.1. INTRODUCCIÓ

La Lisil Oxidasa (LOX) és una amino oxidasa dependent de coure que catalitza la reacció d'oxidació dels grups amino d'algunes proteïnes en residus de lisina i hidroxilisina. Aquesta oxidació comporta la formació de grups semialdehid (peptidil α -aminoadíplic- δ -semialdehid o alisina), que condensen espontàniament amb residus anàlegs de la mateixa o d'altres proteïnes, generant-hi enllaços creuats [191]. La LOX és la proteïna més estudiada de la seva família, que en mamífers consta de quatre isoenzims més: *LOX-like* (LOXL) 1, LOXL2, LOXL3 i LOXL4. Els cinc membres de la família presenten una elevada homologia a l'extrem C-terminal, on s'hi troba el domini catalític. Tot i que sembla que totes elles presenten activitat lisil oxidasa, aquests enzims mostren patrons d'expressió diferents, de manera que probablement desenvolupin funcions diverses [192, 193].

Els substrats més clarament establerts de la LOX són el col·lagen i l'elastina [194]. Aquest enzim es troba fortament associat a aquestes molècules de la MEC, sobre les quals exerceix un paper estabilitzador i insolubilitzant, participant així en la maduració i manteniment de la MEC [194]. En teixits adults humans, trobem LOX en abundància associada a fibres de col·lagen, principalment a la pell i a l'aorta; en teixits embrionaris, la trobem associada tan a col·lagen com a elastina [195, 196]. La modificació de la MEC per la LOX és un factor crític en el desenvolupament i manteniment del teixit connectiu de diversos sistemes de l'organisme, tals com l'ossi, el respiratori i el CDV, però també d'algunes condicions patològiques [197, 198]. De fet, els ratolins deficients per aquest enzim moren perinatalment, presenten aortes tortuoses i fràgils, i una elevada freqüència de ruptures diafragmàtiques [199, 200].

4.2. BIOSÍNTESI DE LA LOX

La LOX és sintetitzada per diversos tipus cel·lulars; a nivell vascular és produïda per fibroblasts, CMLV i CE. Es sintetitza com a precursor o preproteïna (**preproLOX**), la qual conté un pèptid senyal de 21 aminoàcids a l'extrem amino terminal [197, 201]. Aquest pèptid mena la preproLOX al sistema de reticle endoplàsmic (RE) i, per tant, a la via de secreció. En el seu transcurs a través del RE i Golgi, el preproenzim pateix una sèrie de modificacions fins a donar una forma catalíticament inactiva de 50 kDa (**proLOX**): en primer lloc es proteolitza el pèptid senyal, a continuació es produeix una N-glicosilació [201], s'incorpora un àtom de Cu (II) [202, 203] i, finalment, es forma el cofactor LTQ (lisil tirosil quinona) a través de la unió covalent dels residus de lisina 320 i tirosina 355 (a la seqüència humana) [203, 204]. Finalment el proenzim (proLOX) es secreta a l'espai extracel·lular [205-209], on és proteolititzat per les procol·lagen C-proteïnases (PCP) codificades pel gen BMP1 [principalment la proteïna morfogènica òssia-1 (BMP-1), i en menor grau la *mammalian Tolloid* (mTLD)], així com per les proteïnases *mammalian tolloid-like* mTLL-1 i mTLL-2 [210]. Aquesta proteòlisi dóna com a resultat la forma madura i catalíticament activa de 32 kDa (**LOX**) i el propèptid de 18 kDa (**LOX-PP**) (Fig. 6) [210-213].

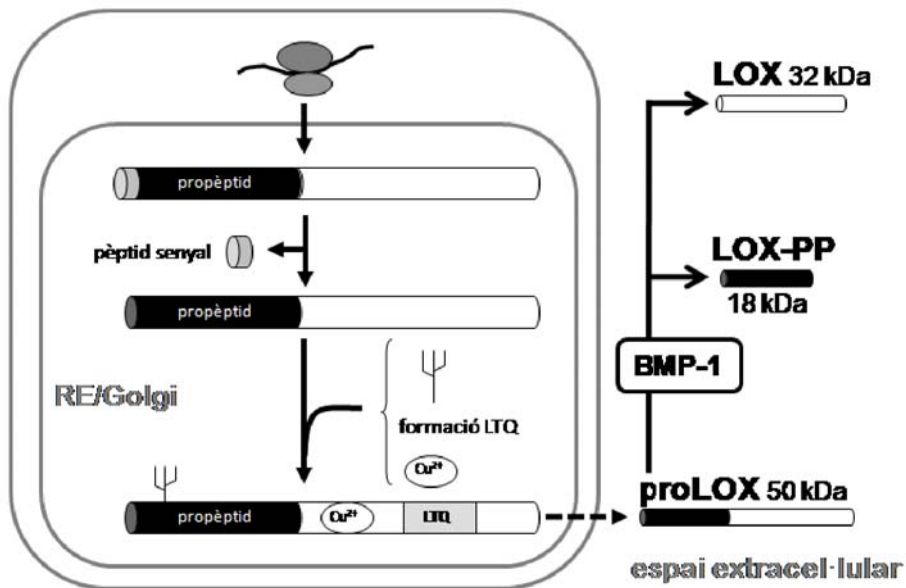


Figura 6. Biosíntesi i funcions de la LOX. Representació esquemàtica mostrant els principals passos de la biosíntesi de la LOX, així com les principals funcions atribuïdes a la LOX catalíticament madura i al seu propèptid. BMP-1, proteïna morfogènica òssia-1; LOX-PP, propèptid de LOX. Imatge adaptada d'Alcudia *et al.* (2008) [214].

INTRODUCCIÓ

Si bé la LOX presenta una localització extracel·lular, sorprenentment, se n'han identificat formes intracel·lulars, tant citosòliques com nuclears [215]. Tot i que els possibles substrats intracel·lulars de la LOX no estan ben establerts, diversos estudis indiquen la participació d'aquest enzim en el control de l'expressió gènica, la motilitat i l'adhesió cel·lulars [192]. A més a més, la LOX participa en processos d'invasió, transició d'epiteli a mesènquima (EMT) i senyalització intracel·lular [216-219].

4.3. ACTIVITAT CATALÍTICA: Mecanisme de reacció

La LOX inicia la formació d'enllaços creuats entre col·làgens i elastina a la MEC, augmentant-ne així la força tensora i la integritat estructural, trets essencials per al bon funcionament del teixit connectiu. El centre actiu responsable de l'activitat catalítica de la LOX es troba en el domini C-terminal, el qual està altament conservat entre els diferents membres de la família i també entre les LOX de diferents espècies. A més del domini d'unió al coure i dels residus d'unió al cofactor LTQ, la regió C-terminal de la LOX conté un domini de tipus receptor de citocines (*cytokine receptor like-domain*) i un domini de tipus receptor de factor de creixement (*growth factor receptor-like domain*) [197, 220].

La LOX catalitza la desaminació oxidativa de residus de lisina i hidroxilisina de les cadenes de col·lagen i elastina [221]. Aquesta reacció es dona en quatre passos, que s'il·lustren a la Fig. 7. En primer lloc es forma una base de Schiff entre la lisina substrat i el cofactor LTQ (I→II). D'aquesta manera, el substrat roman unit a l'enzim fins que una base, probablement una de les histidines del centre actiu, provoca el desplaçament dels electrons del substrat carbanió al cofactor LTQ, provocant-ne la reducció (II→III). La hidròlisi de l'amina formada allibera com a producte l'aldehid derivat de la lisina, que espontàniament reaccionarà amb residus anàlegs de la mateixa proteïna o de proteïnes veïnes. Així, s'estableixen enllaços covalents inter- i intra- moleculars entre aquests substrats (III→IV). Un cop alliberat l'aldehid, l'enzim reduït es torna a reoxidar amb O₂ amb l'ajuda del Cu (II), produint peròxid d'hidrogen i amoni. Així es completa el cicle catalític i l'enzim, oxidat, torna a ser funcional (IV→V→I) [194, 222, 223]. Els diferents mètodes que s'utilitzen per determinar l'activitat LOX es basen en la mesura del peròxid d'hidrogen alliberat en aquesta darrera etapa (Fig. 7).

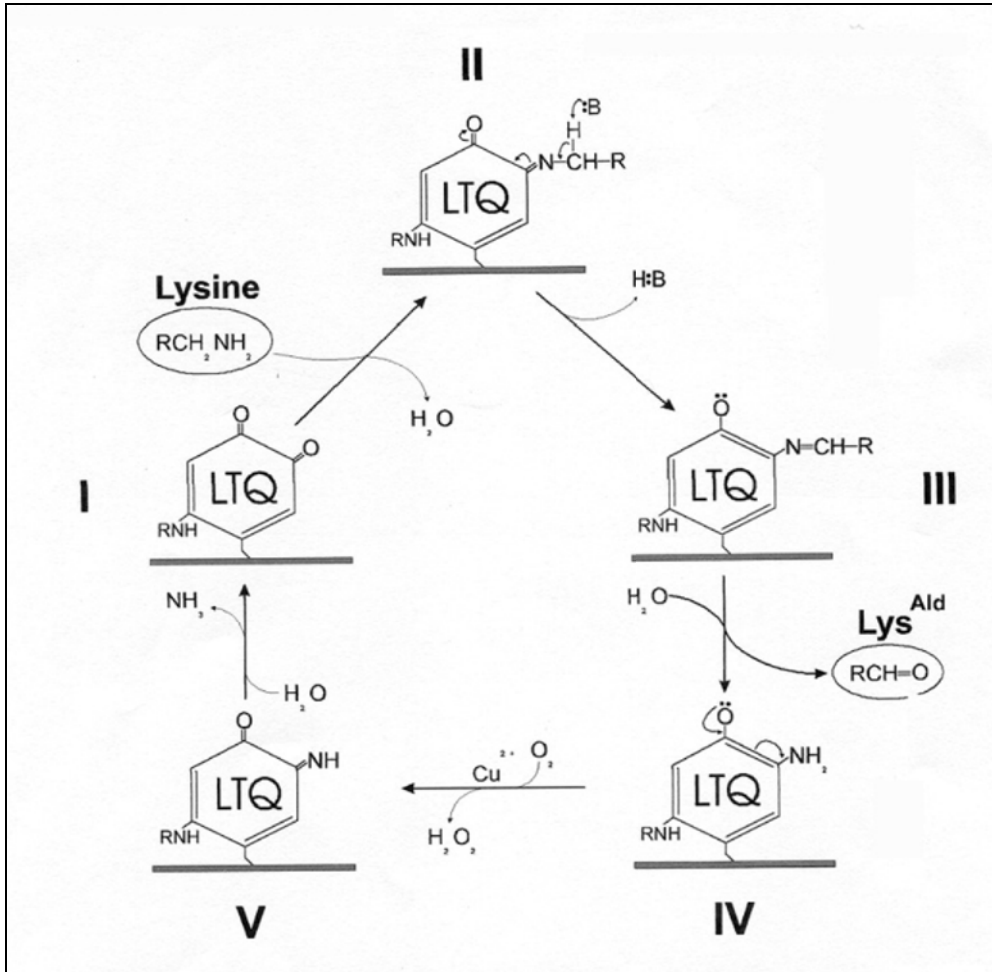


Figura 7. Mecanisme de reacció de la LOX. RNH representa el residu peptidil lisina 314 de la LOX bovina, la lletra B representa una base genèrica, LTQ equival al cofactor lisina tirosilquinona, i Lys^{Ald} representa el producte final de la reacció que s'unirà espontàniament i covalent amb residus anàlegs. Figura modificada de Smith-Mungo *et al.* (1998) i Akagawa *et al.* (2001) [194, 222].

La LOX pot interactuar amb altres substrats proteics a part del col·lagen i l'elastina, com a mínim *in vitro*. L'enzim purificat pot oxidar residus peptidil lisina en proteïnes globulars bàsiques amb punts isoelèctrics superiors a 8, com les histones H1 i H2 [224], o fins i tot factors com el bFGF [225]. La possibilitat d'utilitzar altres proteïnes com a substrat més enllà de components de la MEC atorga a la LOX la capacitat de regular múltiples processos cel·lulars, tal i com anirem comentant a continuació.

INTRODUCCIÓ

4.4. EXPRESSIÓ I REGULACIÓ DE LA LOX

La LOX s'expressa en un ampli ventall de cèl·lules, entre les quals en destaquen fibroblasts, CE, CMLV, osteoblasts i condrocits [226-229]. A nivell tissular, trobem una abundant expressió de LOX a l'aorta fetal i adulta, la placenta, la pell i el pulmó [195, 196]. La LOX juga un paper important durant el desenvolupament, variant la seva expressió en funció de l'estadi embrionari [196, 199, 200, 230]. L'expressió de LOX disminueix notablement amb l'edat, contribuint a la pèrdua d'elasticitat dels teixits pròpia de l'envelliment. L'expressió de la LOX també es veu alterada en processos fisiopatològics, com la cicatrització de ferides, la tumorigènesi o la fibrosi. És obvi, doncs, que la LOX es trobi regulada per una multitud d'efectors, entre els quals hi trobem citocines, factors de creixement, segons missatgers, ions metàl·lics o hormones. La Taula 1 resumeix els efectes dels reguladors de la LOX descrits fins ara.

4.5. ALTRES FUNCIONS BIOLÒGIQUES DE LA LOX: activitats intracel·lulars i intranuclears

La LOX madura (32kDa) no només es localitza a l'espai extracel·lular, sinó també a nivell intracel·lular en fibroblasts, condrocits, CMLV i en una gran varietat de cèl·lules no fibroblàstiques [215, 231, 232]. L'origen d'aquestes formes actives intracel·lulars de la LOX és desconegut, tenint en compte que la maduració de l'enzim es realitza a l'espai extracel·lular. S'ha suggerit la captació i internalització de la LOX madura des de l'espai extracel·lular, tot i que de moment se'n desconeix el mecanisme, que, segons Nellaippan *et al.*, seria independent de l'activitat enzimàtica de LOX [233].

La LOX intracel·lular s'associa al control de l'adhesió i migració cel·lular en cèl·lules canceroses. La LOX pot oxidar residus de lisina del bFGF, inhibint així els seus efectes en la progressió en el cicle cel·lular i en la fosforilació de MAPK [225]. Sorprenentment, també s'ha localitzat LOX al **nucli** [215, 233], on controlaria l'expressió gènica. S'han observat alteracions en la condensació de cromatina dependents de LOX [215, 231, 233, 234], fet que és coherent amb la seva capacitat d'utilitzar histones H1 i H2 com a substrat, com a mínim *in vitro* [235, 236]. De fet, la LOX, mitjançant la seva activitat enzimàtica, és capaç de regular l'activitat transcripcional de gens implicats en la síntesi de MEC o en la progressió tumoral, tals com el col·lagen III, la β -catenina, la ciclina D1 o l'elastina [237-239].

Taula 1. Principals reguladors de la LOX i els seus efectes.

Molècula efectora	Teixit o tipus cel·lular	Efecte	Referències
IFN- γ	Rn: CML d'aorta	↓ nivells ARNm ↓ vida mitjana ARNm	[240]
bFGF	Mm: Osteoblasts	↓ nivells ARNm (1-10 nM) ↑ nivells ARNm (0,01-0,1 nM)	[241]
bFGF i IGF-1	Rn: Teixits bucal inflamats Rn: Fibroblasts	↑ nivells ARNm	[242]
PGE ₂	Rn: Fibroblasts de pulmó	↓ activitat enzimàtica	[243, 244]
	Hs: Fibroblasts embrionaris de pulmó	↓ nivells ARNm	[245]
TGF- β 1	Rn: CML d'aorta	↑ nivells ARNm	[243, 245-250]
	Hs: fibroblasts gingivals	↑ activitat enzimàtica	
	Mm: Cèl·lules tipus osteoblast		
Testosterona	Bt: CML d'aorta	↑ activitat enzimàtica	[251]
AMPc	Hs, Rn: CMLV	↑ nivells ARNm	[244, 252]
PDGF	Rn: CMLV	↑ nivells ARNm	[253, 254]
Angiotensina II			
LDL	CE (Hs, Ss)	↓ nivells ARNm ↓ activitat enzimàtica	[255]
	Hs: CMLV	↓ nivells ARNm	dades no publicades
TNF- α	Mm: osteoblasts	↓ nivells ARNm	[256]
	CE (Hs, Ss, Bt)	↓ activitat enzimàtica	[257]
	Rn: fibroblasts cardíacs	↓ nivells ARNm (1-5 ng/ml) ↑ nivells ARNm (10-20 ng/ml)	[258]
Hipòxia	Hs: diversos tipus cel·lulars	↑ nivells ARNm	[219]
Homocisteïna	Hs: CE	↓ activitat enzimàtica	[259]
Fibronectina cel·lular	Mm: fibroblasts embrionaris	↑ activació proteolítica	[260, 261]
Endotelina	Gg: CMLV aorta	↓ nivells ARNm	[262]

Rn, rata; **Mm**, ratolí; **Hs**, humans; **Bt**, vaca; **Gg**, pollastre; **Ss**, porc.

Un aspecte destacable de la biologia de la LOX és el fet que el seu propèptid presenta activitat biològica. El **LOX-PP** s'ha detectat dins el compartiment cel·lular, fins i tot al nucli [263] [264]. La cèl·lula podria internalitzar el propèptid sense l'ajuda de cap receptor específic gràcies al seu elevat punt isoelèctric, que és de 12,5 [265, 266]. A més a més, el LOX-PP té un senyal putatiu de localització nuclear [215, 267] que podria ser el responsable de la seva translocació al nucli. La

INTRODUCCIÓ

presència del propèptid al nucli s'ha relacionat amb la regulació dels microtúbuls durant el desenvolupament dendrític en cèl·lules de Purkinje [264]. El LOX-PP també sembla jugar un paper important en processos metastàtics, ja que la seva expressió ectòpica reverteix el fenotip de fibroblasts transformats per *ras* de manera independent de l'activitat lisil oxidasa [266].

La sublocalització de la LOX a la cèl·lula sembla ser dependent del moment del cicle cel·lular en que es troba. Així, en osteoblasts en proliferació, el LOX-PP s'ha associat principalment a Golgi i al reticle endoplàsmic, mentre que la LOX madura s'ha localitzat al nucli i a la regió perinuclear. En canvi, en osteoblasts en diferenciació, tant el propèptid com la forma madura de la LOX s'han localitzat en els microtúbuls [263].

4.6. LA LOX EN EL DESENVOLUPAMENT

La LOX és essencial per al desenvolupament embrionari en mamífers. La inactivació del gen LOX en ratolins provoca la mort perinatal deguda a defectes greus en la formació de la pell i dels sistemes CDV i respiratori. A més a més, aquests ratolins presenten elastòlisi generalitzada i una deposició de col·lagen anormal en diversos teixits [199, 200, 268]. També en models murins de desenvolupament embrionari, s'ha observat que el patró d'expressió temporal de la LOX se superposa amb el dels principals col·làgens (I i IV) i l'elastina [269, 270]. Aquest fet fa que sigui sorprenent que els principals problemes en el desenvolupament no apareguin fins als darrers estadis, suggerint un efecte compensatori per part dels altres isoenzims de la família [271]. La funció més notòria de la LOX durant l'embriogènesi sembla ser el d'atorgar unes propietats físiques òptimes a la MEC de diversos teixits [271]. No obstant, la LOX també sembla exercir un paper clau dirigint els processos cel·lulars propis del desenvolupament, a jutjar pels treballs publicats durant els darrers anys que mostren les accions intracel·lulars de la forma madura de la LOX i del seu propèptid [263].

4.7. PATOLOGIES RELACIONADES AMB ALTERACIONS EN L'ACTIVITAT LOX

S'han descrit múltiples patologies associades a l'alteració del patró d'expressió de la LOX. La majoria d'aquestes patologies presenten un desequilibri en el balanç síntesi/degradació de la MEC. Per exemple, s'han observat nivells elevats de LOX en **fenòmens fibròtics** a nivell hepàtic, miocàrdic, pulmonar o renal [194, 223, 272-277]. En la majoria dels casos hi està implicat el TGF- β 1, un factor pro-fibròtic que estabilitza l'ARNm de la LOX i en facilita la maduració en incrementar l'expressió de les PCP [248, 278, 279]. La LOX també està involucrada en **processos neuro-degeneratius** com l'Alzheimer, la demència o l'esclerosi lateral amiotròfica [280-282]. La reducció de l'expressió de la LOX, per altra banda, s'ha relacionat fortament amb l'**emfisema pulmonar** [283, 284].

Més enllà dels problemes de teixit connectiu derivats d'un excés o d'un dèficit en l'activitat LOX, les múltiples funcions d'aquest enzim i del seu propèptid fan que la LOX estigui implicada en patologies complexes com el càncer i les malalties CDV. El paper de la LOX en aquestes patologies és complicat i en alguns casos controvertit, tal i com comentarem a continuació.

4.7.1. LOX i càncer

La LOX es va identificar com a **supressora de la tumorigènesi** induïda per *ras* [285]. Diversos estudis han observat un descens en l'expressió de la LOX en línies tumorals de fibrosarcoma, coriocarcinoma, rabdomiosarcoma i adenocarcinoma, així com en carcinomes de colon, esòfag, gàstric, pancreàtic i prostàtic, i en melanomes [198, 286-291]. Així mateix, la inhibició experimental de LOX pot promoure la transformació maligna de fibroblasts en cultiu [292].

La LOX inhibeix la transformació induïda per *ras* a través dels seus efectes en la senyalització intracel·lular [282]. L'expressió de LOX evita l'activació del factor de transcripció NF- κ B i fa disminuir els nivells de la proteïna antiapoptòtica Bcl2 [239, 293, 294]. La inhibició de la transformació induïda per *ras* sembla ser principalment **dependent del propèptid**, i no de la forma catalíticament activa. El LOX-PP pot inhibir el fenotip transformat de cèl·lules de càncer de mama, pulmó i pàncrees [266, 293, 295]. En cèl·lules de càncer de mama, l'expressió ectòpica del propèptid de LOX atenua la senyalització d'integrines via FAK i p130^{Cas} (que indueix

INTRODUCCIÓ

proliferació cel·lular) [296]. L'activitat lisil oxidasa també pot exercir efectes supressors de la proliferació tumoral: la LOX pot oxidar el bFGF, inhibint així els seus efectes en la progressió del cicle cel·lular i en la fosforilació de MAPK [225].

Tot i que el paper de la LOX com a supressora de tumors està àmpliament acceptat, en els últims anys ha generat una certa controvèrsia, ja que també s'han descrit nivells elevats d'aquesta proteïna en línies cel·lulars i en els seus teixits tumorals corresponents [282], com per exemple en càncer de mama, cèl·lules escamoses de cap i coll, pròstata o ronyó [219, 297, 298]. A més, per a alguns tipus de càncer, l'augment dels nivells de LOX correlacionen en la clínica amb la metàstasi i la progressió tumoral [219, 299].

La LOX promou la migració i l'adhesió en cèl·lules invasives de càncer de mama a través d'un mecanisme dependent de la producció de peròxid d'hidrogen derivada de la seva activitat catalítica, i mitjançant l'activació de la via de senyalització FAK/Src [218, 300]. En línies cel·lulars derivades de càncer de mama poc invasives, l'expressió exògena de LOX promou l'activació de Src i FAK, que al seu torn activen la via de senyalització p130^{Cas}/Crk/DOCK180, la qual, en augmentar l'activitat de Rac i Cdc42 i disminuir l'activitat Rho, promou el canvi a un fenotip migratori mitjançant la reorganització dels filaments d'actina [301].

La hipòxia, un fenomen característic del procés tumoral, indueix l'expressió de LOX en cèl·lules tumorals de càncer de mama a través del factor HIF-1. La inducció de la LOX per hipòxia activa la motilitat cel·lular via activació de FAK a través d'un mecanisme dependent de H₂O₂ i de l'activació de les integrinesβ1 [219, 302]. De fet, la inhibició de LOX en tumors ortotòpics comporta una reducció del grau de metàstasi [219]. En concordança amb aquest paper de la LOX en la progressió tumoral, diversos estudis demostren que l'activitat LOX, induïda per hipòxia a través de **HIF-1**, participa en l'EMT [217, 303, 304]. En els últims anys s'han realitzat estudis que mostren que la LOX és essencial en la **formació del nínxol premetastàtic** en cèl·lules de càncer de mama hipòxiques per un mecanisme dependent de HIF-1. L'acumulació de LOX i fibronectina en resposta a hipòxia en zones premetastàtiques promou el reclutament de **cèl·lules derivades de medul·la òssia CD11b+** [305, 306]. Aquestes cèl·lules creen l'entorn adequat per a la subsegüent invasió i creixement de cèl·lules tumorals [307-309]. Finalment, mitjançant la seva activitat catalítica, la LOX pot activar HIF-1 via **PI3K-Akt**. Per tant, LOX i HIF-1 actuarien sinèrgicament fomentant la formació de tumors [310].

Recentment, Oleggini i els seus col·laboradors han demostrat que la LOX, mitjançant l'ús de la histona H1 com a substrat i la conseqüent alteració en el grau de condensació de la cromatina, indueix l'activació del promotor del virus tumoral mamari del ratolí (**MMTV**), un conegut mutagen insercional que causa carcinomes mamaris [311]. Aquest resultat s'afegeix a la gran quantitat d'estudis que relacionen la LOX amb el càncer, molts aparentment contradictoris, però que en definitiva ens indiquen que el paper de la LOX en la tumorigènesi varia en funció de la localització i el tipus cel·lular i de l'estadi de la transformació maligna, i ens suggereixen que la LOX podria ser una bona diana terapèutica en el tractament i la prevenció de les metàstasis tumorals [219].

4.7.2. LOX i malalties cardiovasculars

A la paret vascular, la LOX s'expressa en fibroblasts, CE i CML. És la isoforma responsable del 80% de l'activitat lisil oxidasa a les CML d'aorta [268]. Mitjançant la generació de ratolins deficientes en la LOX, s'ha vist que aquest enzim és clau tant en el desenvolupament com en el manteniment del sistema CDV. Els animals LOX^{-/-} moren perinatalment i presenten greus alteracions a nivell vascular, incloent-hi aortes tortuoses i aneurismàtiques. A nivell microscòpic, s'hi observen fibres elàstiques fragmentades, discontinuïtats en la capa mitjana i alteracions en la morfologia de les CE, les quals perden la seva adhesió a la lamina basal [199, 200].

4.7.2.1. LOX i disfunció endotelial

En els ratolins LOX^{-/-} es perd la integritat de la barrera endotelial [199]. Els estudis desenvolupats pel nostre grup demostren que, *in vitro*, la inhibició de la LOX augmenta la permeabilitat de CE cultivades en monocapa, permetent l'intercanvi de macromolècules [255]. Aquests resultats suggereixen que la desestructuració de la MEC, com a conseqüència de l'alteració de la LOX, afecta la funcionalitat de la barrera endotelial. De fet, factors desencadenants de disfunció endotelial com la **hipercolesterolèmia** i la **hiperhomocisteïnèmia** disminueixen l'expressió i/o l'activitat enzimàtica de LOX en CE en cultiu i/o a la paret vascular. Així, en un model porcí d'aterosclerosi primerenca, es va observar una disminució dels nivells d'expressió de la LOX després de l'administració de dieta hipercolesterolèmica. Els estudis *in vitro* han demostrat que concentracions aterogèniques d'LDL disminueixen tant l'expressió com l'activitat de LOX en CE a través d'un mecanisme transcripcional [255, 259]. Pel que fa a l'homocisteïna (HC), s'ha observat que, a concentracions patològiques, inhibeix l'activitat lisil oxidasa en CE mitjançant un

INTRODUCCIÓ

mecanisme que sembla estar lligat l'estrès oxidatiu generat pel grup tiol de la HC [259]. Anàlogament, la citocina proinflamàtoria **TNF- α** , que promou disfunció endotelial i aterosclerosi [21, 22, 312], també redueix l'expressió i l'activitat de la LOX en CE i *in vivo* a la paret vascular, i ho fa a través d'un mecanisme transcripcional dependent de PKC i de proteïnes geranilgeranilades com RhoA [257, 313]. Cal destacar que les estatines contraresten l'efecte inhibitori del TNF- α i de les LDL sobre l'expressió i l'activitat de la LOX en CE [313]. Aquests fàrmacs hipolipemiants, àmpliament utilitzats en la clínica, milloren la funció endotelial com a conseqüència de mecanismes dependents i independents (pleiotròpics) de la reducció dels nivells del colesterol [314-318]. El tractament amb estatines també va contrarestar l'increment de la permeabilitat endotelial induïda per les LDL i va normalitzar l'expressió vascular de la LOX en el model porcí d'hipercolesterolèmia, fet que suggereix que la regulació de LOX per aquests fàrmacs pot contribuir al seu efecte beneficiós a nivell vascular [313].

Per tant, els resultats del nostre grup indiquen que la inhibició de la LOX podria estar relacionada amb la **disfunció endotelial** desencadenada per factors de risc ateroscleròtic i citocines proinflamàtores, implicant aquest enzim en les fases inicials del procés ateroscleròtic [214, 255, 257, 259].

4.7.2.2. Regulació de la LOX a les CMLV

L'activitat LOX té propietats **quimiotàctiques** per CMLV i monòcits, tot i que també podria participar en el control de la proliferació i la migració de les primeres [319, 320]. Així, diversos factors de creixement i citocines implicats en processos de restenosi i aterosclerosi tenen la capacitat d'induir la LOX en CMLV. Per exemple, el **TGF- β 1** n'incrementa l'expressió i l'activitat. I el **PDGF**, un potent agent mitògen que promou l'engruïment de la neoíntima en models d'angioplàstia [321], incrementa l'expressió de la LOX en CMLV [253], la qual oxida el seu receptor, el **PDGFR- β** , millorant així la sensibilitat de les cèl·lules a agents quimioatracients [322]. El **factor estimulant de colònies de granulòcits i macròfags (GM-CSF)**, també implicat en el remodelat vascular, indueix l'activitat lisil oxidasa en augmentar l'expressió de la LOX i de la BMP-1 en CMLV [323]. Finalment, la generació de **peròxid d'hidrogen** com a subproducte de l'activitat LOX promou la formació d'adhesions focals i de fibres d'estrès en CMLV, promovent la resposta quimiotàctica [320]. La LOX, per tant, podria induir la deposició de MEC afavorint l'engruïment de la neoíntima associat a la progressió de la placa ateroscleròtica i la restenosi [324, 325].

4.7.2.3. Paper de la LOX en l'inici, la progressió i l'estabilitat de la placa ateroscleròtica

Si bé no existeixen estudis que analitzin en detall el paper de la LOX en l'aterosclerosi, sí que s'ha analitzat en profunditat la seva capacitat de controlar processos clau en la biologia de les cèl·lules vasculares (com ara la proliferació, la migració cel·lulars o la síntesi de matriu extracel·lular), els quals participen en l'inici, la progressió i l'estabilitat de la lesió. Els estudis realitzats pel nostre grup en el model porcí d'hipercolesterolèmia indiquen que durant els primers estadis del procés ateroscleròtic es produeix una disminució de l'expressió de la LOX, fet que s'observa en les aortes de porcs sotmesos a dieta hipercolesterolèmica [255, 326].

En canvi, s'ha descrit un increment de LOX en models d'**aterosclerosi avançada** en **plaques estables i fibròtiques** [324, 325]. Per altra banda, la inducció de LOX per hipòxia en CE recolza la seva implicació en els processos d'**angiogènesi** propis de les lesions avançades. Pel que fa al possible paper de la LOX en el control de l'estabilitat de la placa, s'ha proposat que un defecte en l'activitat LOX podria afeblir l'estructura de la MEC i augmentar-ne el **risc de ruptura** [240]. En aquest sentit, l'**IFN- γ** , una citocina proinflamatòria associada a processos de degradació de la MEC i de remodelat vascular, que es troba augmentat tant **en aneurismes** com en **plaques ateroscleròtiques que han patit processos de ruptura** [327], redueix els nivells de LOX en CMLV i és un important regulador negatiu de la biosíntesi de col·lagen [240, 328]. Aquests mecanismes poden explicar la seva contribució a l'aneurisma i la inestabilització de la lesió. Finalment, cal destacar que estudis en ratolins deficientes en APOE i IL-6, que presenten una alteració del patró lipídic amb increments en colesterol total i LDL, mostren una disminució dels nivells d'ARNm de LOX a nivell aòrtic, una reducció del contingut de col·lagen i un increment en l'activitat MMP-9, fets que contribueixen a la desestructuració de la MEC i la inestabilització de la lesió [329].

En resum, aquests estudis suggereixen que la regulació de l'expressió de LOX podria contribuir a l'inici, la progressió i la inestabilització de la lesió.

INTRODUCCIÓ

4.7.2.4. Paper de la LOX en la restenosi

Tal i com s'ha indicat en el punt 6.7.2.2, la LOX participa en el control de la migració i la proliferació de CMLV, fenòmens clau en el procés de restenosi. Per tant, es podria especular amb la participació de la LOX en aquest procés, sobretot si tenim en compte que el TGF- β 1 i el PDGF, inductors de l'expressió de LOX en CMLV, són factors fonamentals en el procés de restenosi [330, 331].

Nuthakki *et al.* (2004) mostren, en un model de **restenosi** induïda per baló en caròtida de rata, que la **inducció de la LOX** precedeix al punt d'acumulació màxima de col·lagen i de major creixement de la neointima, i conclouen que el paper de la LOX en el desenvolupament de processos restenòtics sembla ser dependent del temps o de l'etapa de la lesió [325].

4.7.2.5. Paper de la LOX en l'aneurisma i la dissecció arterial

Diversos estudis han suggerit que una reducció en l'expressió de LOX podria estar involucrada en la formació d'aneurismes. Per una banda, s'han observat **nivells baixos d'expressió o d'activitat LOX** en models animals d'aneurismes [110, 332-335]. En un model d'aneurisma cerebral en rata, es va observar que el tractament amb BAPN provocava una major formació d'aneurismes [335]. En el mateix sentit, la inducció d'**aneurisma d'aorta abdominal (AAA)** per elastasa en rates o clorur càlcic en ratolins comporta una inhibició de l'expressió de la LOX [110, 334]. Tanmateix, s'ha descrit que la sobre-expressió local de LOX en els ratolins tractats amb clorur càlcic normalitza el diàmetre aòrtic i evita la formació d'AAA. De fet, en aquest model, la sobre-expressió de LOX redueix la resposta inflamatòria vascular, disminuint la secreció de MCP-1, la infiltració de macròfags i l'activació de JNK, fet que contribueix a una menor progressió de l'AAA [336].

Anàlogament, la reducció de la LOX s'ha relacionat amb una **pèrdua d'elasticitat vascular** i amb fenòmens de **calcificació**, un procés que s'associa a una major progressió de l'AAA [337]. La possible alteració en l'estructura de la MEC associada a la reducció de LOX s'ha implicat també en un cas de **dissecció espontània d'artèria coronària** [338].

Tots aquests resultats evidencien la importància de la LOX en la funcionalitat del sistema CDV i posen de manifest la necessitat de realitzar nous estudis que aprofundeixin en el paper d'aquest enzim en el desenvolupament de patologies CDV.

5. LA FIBULINA-5

5.1. INTRODUCCIÓ

La **Fibulina-5 (FBLN5, UP50, EVEC, DANCE)** és una glicoproteïna de MEC essencial per a la formació i manteniment de les fibres elàstiques [339-343]. L'interès per la FBLN5 va sorgir el 1999, quan dos grups d'investigació, de manera independent, la van identificar com una proteïna expressada a la vasculatura durant el desenvolupament embrionari i en situacions patològiques. Inicialment la batejaren com a EVEC (*Embryonic Vascular EGF-like repeat-containing protein*) [340] i DANCE (*Developmental Arteries and Neural Crest EGF-like protein*) [344]. Poc temps després s'identificà com el cinquè membre de la família de les fibulines.

En mamífers, la **família de les fibulines** consta de 7 membres. Són glicoproteïnes que se secreten i s'associen a membranes basals, fibres elàstiques i altres components de MEC [345]. La família es defineix per la presència de dos mòduls estructurals: el **domini II**, amb diverses repeticions en tàndem de **mòduls epidermal growth factor-like (EGF-like)**, i el **domini III**, a l'extrem C-terminal, amb un **mòdul de tipus fibulina**, específic de les fibulines i les fibrilines; el domini I, en posició amino-terminal, és variable. La majoria dels mòduls EGF-like contenen una seqüència consens d'unió a calci, anomenant-se **mòduls epidermal growth factor-like d'unió a calci (cbEGF)** (Fig. 8).

Les glicoproteïnes de la MEC poden tenir un pes molecular relativament gran, com les laminines, la fibronectina o l'elastina, o bé més petit, les quals, més que un paper estructural, tenen la funció de modular el comportament i funcions cel·lulars. Les fibulines, que formen part d'aquest segon subgrup, reuneixen i estableixen estructures de la MEC durant els processos d'organogènesi, vasculogènesi, fibrogènesi i tumorigènesi [346]. A més de donar suport a components de la MEC, les fibulines poden actuar com a mediadores de la comunicació intercel·lular i cèl·lula-matriu [347]. Les múltiples funcions que poden realitzar les fibulines són fruit de la seva capacitat d'interaccionar i unir-se a d'altres proteïnes de la MEC, i en el cas concret de la FBLN5, també a integrines de superfície cel·lular.

INTRODUCCIÓ

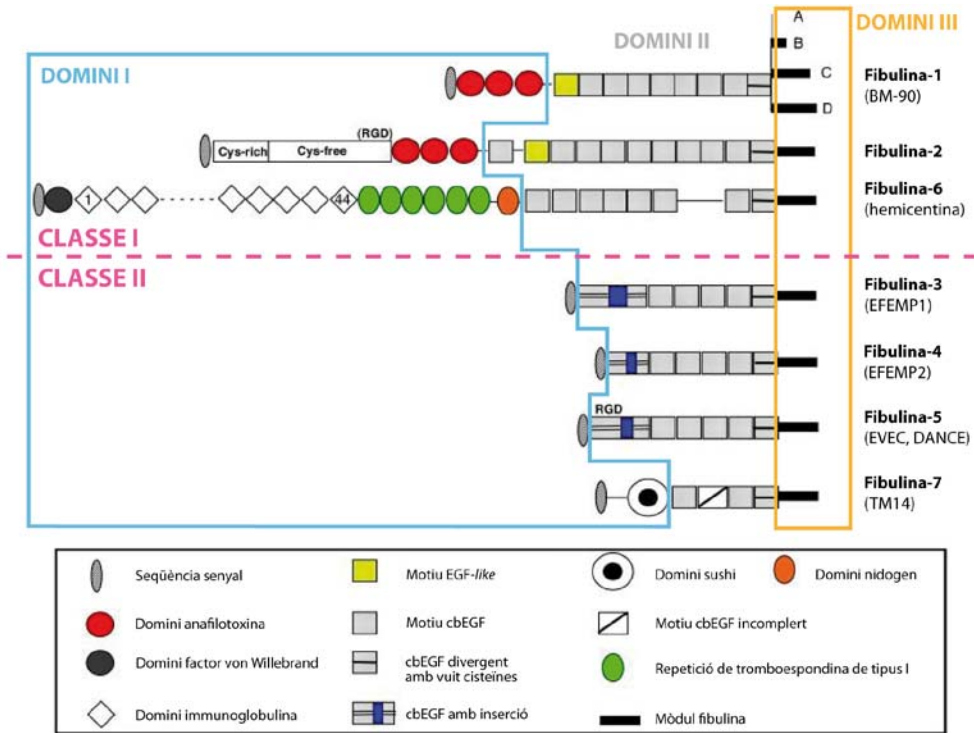


Figura 8. Representació esquemàtica de la família de les fibulines. Els set membres de la família presenten una disposició modular similar, dividida en tres dominis: I, II i III. El domini I, a l'extrem N-terminal, és variable, tant pel que fa a la llargada com als motius. El domini II, al centre, consta de motius EGF-like. El domini III, a l'extrem C-terminal, conté un mòdul de tipus fibulina. Les fibulines es classifiquen en dos subgrups segons el domini I: la classe I, que inclou les fibulines llargues (fibulina-1, -2 i -6) i la classe II, amb les fibulines curtes (fibulina-3, -4, -5 i -7). La fibulina-5 conté una seqüència RGD evolutivament conservada, mentre que la seqüència RGD a la fibulina-2 no està conservada entre espècies. Els parèntesi indiquen els sinònims de les corresponents fibulines. Figura adaptada de Yanagisawa *et al.* (2009) [348].

5.2. PROPIETATS FÍSICO-QUÍMIQUES I ESTRUCTURALS

La FBLN5, en mamífers, té un pes molecular teòric d'uns 50 kDa. La seva glicosilació als microsomes dona lloc a una proteïna de 64-66 kDa [340]. Forma part de la classe II de les fibulines, les denominades "curtes" (Fig. 8). Igual que la resta de fibulines, la FBLN5 té un pèptid senyal per a la via de secreció i diverses repeticions en tàndem de mòduls cbEGF-like.

5.2.1. Els motius EGF-like

El motiu **EGF-like** és molt freqüent en proteïnes dirigides a vies de secreció i està present en moltes proteïnes de MEC, com les fibrilines 1 i 2 o el nidogen. També el trobem en reguladors de la coagulació sanguínia com la trombomodulina, en el receptor d'LDL (LDLR), en les proteïnes d'unió al TGF- β latent (LTBP), o en les proteïnes involucrades en diferenciació cel·lular Notch, Delta i Serrate [349].

Els mòduls **cbEGF** són un subgrup del motiu EGF-like que contenen una seqüència d'aminoàcids particular que els permet unir-se a calci. Repeticions en tàndem de dominis cbEGF formen estructures helicoidals allargades de tipus vara que s'estabilitzen amb ponts disulfur i s'ordenen seguint un patró característic, conferint integritat estructural a les proteïnes [349, 350]. Les fibulines-3, -4 i -5 contenen sis dominis cbEGF; el primer conté una inserció rica en prolines, i el sisè és un domini divergent amb vuit cisteïnes. La FBLN5, però, és l'únic membre de la família que conté un domini conservat RGD. Aquest es troba ubicat al primer domini cbEGF (Fig. 8).

5.2.2. El motiu RGD

El motiu **RGD** és una seqüència d'arginina-glicina-aspartic (RGD) evolutivament conservada i present en la majoria de llocs de reconeixement a integrines ($\alpha 5\beta 1$, $\alpha 11\beta 3$, i totes les integrines $\alpha v\beta$) [351]. Les proteïnes de MEC amb motius RGD transmeten senyals de l'entorn cel·lular a les cèl·lules mitjançant la unió a integrines, activant vies de senyalització que promouen canvis en el citoesquelet o en l'expressió de proteïnes reguladores de matriu [352-354]. La presència d'un domini RGD en la FBLN5 la diferencia de la resta de fibulines i li confereix unes propietats úniques que li permeten actuar com a nexa entre les cèl·lules i les proteïnes estructurals de la MEC [341].

5.3. PATRÓ D'EXPRESSIONIÓ

La FBLN5 és una proteïna d'expressió força ubiqüa. A nivell vascular s'expressa en CE, CMLV i fibroblasts [340, 344]. Durant l'embriogènesi, s'expressa abundantment en les regions d'EMT durant el desenvolupament de les artèries (sobretot les de gran calibre), al coixí endocàrdic, la cresta neural i al teixit mesenquimal [347]. En adults, els nivells d'expressió baixen dràsticament, excepte a l'úter, que manté una

INTRODUCCIÓ

angiogènesi cíclica. Tot i això, també trobem FBLN5 en els teixits adults, principalment en els que són rics en fibres elàstiques com les grans artèries, el cor, el pulmó, la pell o el colon; i també a l'ovari, el ronyó, el pàncrees i els testicles. Els nivells d'expressió en vasos adults poden augmentar significativament en resposta a dany vascular o en l'aterosclerosi [340, 344].

5.4. INTERACCIONS MOLECULARS

La FBLN5 és una molècula multifuncional que pot exercir diversos efectes segons el context. Aquesta versatilitat es deu en gran part a la multiplicitat dels seus lligands, que es resumeix a la Taula 2. Així, segons les interaccions moleculars de la FBLN5 amb altres components de la matriu, la FBLN5 regula processos diversos com l'elastogènesi, l'angiogènesi o l'adhesió i proliferació cel·lulars.

Taula 2. Interaccions moleculars de la FBLN5.

Interacció amb	Lloc(s) d'unió a FBLN5	Funció cel·lular i/o biològica	Referències
FBLN5	ND	Desconeguda	[355, 356]
Tropoelastina	cbEGF	Elastogènesi	[355, 357]
LOXL1	Domini C-terminal	Elastogènesi	[358, 359]
LOXL2, 4	Mòdul de tipus fibulina	Elastogènesi	[358]
Emilina-1	ND	Elastogènesi	[360]
LTBP-2	6 ^e cbEGF	Elastogènesi	[361]
Fibrilina-1	N- i C-terminal	Elastogènesi	[362, 363]
SOD3	Domini C-terminal	Modulació de l'estrès oxidatiu	[364]
$\alpha 5\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$	RGD	Adhesió cel·lular Antagonisme de la senyalització per fibronectina	[365]
$\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$	RGD	Adhesió cel·lular	[341]
$\alpha 9\beta 1$	ND	Adhesió cel·lular	[341]
Lipoproteïna(a)	Domini C-terminal	Desconeguda	[366]

ND, no determinat.

Des de la seva identificació el 1999 fins a l'actualitat, s'han pogut caracteritzar alguns dels factors implicats en la regulació de la FBLN5 (Taula 3), així com establir les funcions cel·lulars que duu a terme. Tot i això, queden molts aspectes per caracteritzar de la biologia de la FBLN5. De fet, gran part de les respostes vehiculades per la FBLN5 depenen del context i del tipus cel·lular (Taula 4). Així,

segons el tipus cel·lular, els canvis fenotípics promoguts per la FBLN5 poden ser fins i tot oposats. Els mecanismes implicats en aquest comportament diferencial de la FBLN5 són desconeguts.

Taula 3. Reguladors de la FBLN5.

Estímul	Tipus cel·lular	Efecte	Referències
TGF-β1	Fibroblasts CE	↑ expressió FBLN5	[367, 368]
Myc	Fibroblasts	↓ expressió FBLN5	[369, 370]
IL-1β	Fibroblasts	↓ expressió FBLN5	[371]
Tropoelastina	Fibroblasts	↑ expressió FBLN5	[372]
Dany pulmonar	Fibroblasts	↑ expressió FBLN5	[371]
VEGF	CE	↓ expressió FBLN5	[368]
Dany vascular Aterosclerosi	CMLV CE	↑ expressió FBLN5	[340, 344, 373]

Taula 4. Efectes específics de context de la FBLN5.

Tipus cel·lular	Efectes	Referències
CE	<ul style="list-style-type: none"> ↑ Adhesió ↓ Proliferació ↓ Invasió ↓ Ramificació angiogènica (<i>sprouting</i>) ↑ Expressió TIMP-1 i 3 ↓ Expressió MMP-2 i 3 ↑ Expressió TSP-1 → ↓ activitat MMP-9 	[341, 344, 368, 374, 375]
CMLV	<ul style="list-style-type: none"> ↑ Adhesió ↓ Proliferació 	[365, 373]
Cèl·lules epitelials	<ul style="list-style-type: none"> ↓ Proliferació 	[367]
Cèl·lules epitelials de càncer de mama	<ul style="list-style-type: none"> ↑ Activitat MMP-2 ↑ Activitat MMP-9 	[376]
Cèl·lules de càncer de pulmó	<ul style="list-style-type: none"> ↓ Expressió MMP-7 	[377]
Fibroblasts	<ul style="list-style-type: none"> ↑ Proliferació 	[367]
Fibrosarcoma	<ul style="list-style-type: none"> ↑ Proliferació ↑ Migració ↑ Invasió 	[367]
Cèl·lules d'estroma vaginal	<ul style="list-style-type: none"> ↓ Activitat MMP-9 	[378]

5.5. PAPER DE LA FBLN5 EN L'ELASTOGÈNESI

L'**elastina** és la responsable de les propietats elàstiques d'extensibilitat i resiliència de la MEC d'una gran varietat de teixits, com els vasos sanguinis de gran calibre, el parènquima pulmonar, la pell o els lligaments elàstics. La seva forma monomèrica, la tropoelastina, s'acobla per formar les fibres elàstiques seguint un procés complex i ordenat que coneixem com a **elastogènesi**. En els darrers anys s'han publicat nombrosos estudis que intenten aclarir com ocorre aquest procés. Tots coincideixen en que per a assolir una matriu elàstica funcional, cal que la tropoelastina interaccioni amb altres proteïnes de matriu, incloent-hi fibrilines i fibulines. Els darrers models proposats atorguen un paper essencial a la FBLN5, així com la fibulina-4, la LOX i la LOXL1.

La participació de la FBLN5 en l'elastogènesi es va suggerir el 2002 quan, de manera simultània, els dos grups d'investigació que van descriure la FBLN5 el 1999 publicaren dos treballs pràcticament idèntics en els quals, mitjançant l'ús de ratolins deficientes per al gen de la FBLN5, mostraven que aquesta proteïna juga un paper essencial en l'organització de les fibres elàstiques. El fenotip dels ratolins *Fbln5*^{-/-} indica un desenvolupament defectuós d'aquestes fibres [341, 343]. A nivell vascular, aquests animals presenten aortes tortuoses i fràgils i una major ramificació vascular a nivell sistèmic. Un estudi més recent mostra que, a la dermis d'aquests animals, l'elastina és immadura, amb un nivell molt baix d'enllaços i que forma glòbuls desvinculats de les microfibrilles [339].

La **tropoelastina**, després de ser secretada per les cèl·lules que la sintetitzen, s'agrega amb altres molècules de tropoelastina, passant de ser una molècula soluble a formar agregats insolubles per un procés anomenat **coacervació** [379-382]. Aquests agregats **maduren** fusionant-se entre ells i donant lloc a agregats més grans [383], els quals s'ordenen prenent com a motllo les **microfibrilles**, formades principalment per fibrilina-1 i -2. Finalment, s'estabilitzen mitjançant l'activitat enzimàtica de LOX i LOXL1 [195, 211, 384, 385].

Inicialment es va pensar que la FBLN5 dirigia la correcta organització de les fibres d'elastina en unir-se simultàniament a tropoelastina, integrines i fibrilina-1 [341, 355, 362, 365, 386, 387]. No obstant, estudis més recents mostren que la interacció entre tropoelastina i FBLN5 no és necessària per a la co-localització d'elastina i microfibrilles [339], i que la unió de la FBLN5 a integrines via RGD tampoc no és necessària per a la formació de les fibres elàstiques [378]. En canvi, la FBLN5

sembla indispensable per a la correcta integració de l'elastina als feixos de microfibrilles [339].

Si bé la FBLN5 facilita la coacervació de tropoelastina *in vitro* (igual que la fibrilina-1) [357, 358, 388], també s'ha observat que alenteix el procés de maduració mitjançant la inhibició de l'ensamblatge i el creixement aberrant dels agregats coacervats [383]. De manera que la FBLN5 (i també la FBLN4) controlaria el tamany dels agregats de tropoelastina impedit que es fessin massa grossos, permetent així una col·locació correcta a les microfibrilles (Fig. 9) [389].

Finalment, els monòmers d'elastina han d'establir enllaços entre ells per tal de formar els polímers d'elastina, procés que inicien els enzims LOX i LOXL. Tot i que el paper que juga la FBLN5 en aquest punt encara no s'ha aclarit del tot, sembla que facilitaria la formació d'enllaços creuats entre molècules de tropoelastina [342]. Per una banda, s'ha observat que la FBLN5 interacciona amb LOXL1, LOXL2 i LOXL4; i que es localitza amb LOXL1 específicament en les zones d'ensamblatge de fibres elàstiques [358, 359]. Segons això, s'ha postulat que la FBLN5, en unir-se tant a la tropoelastina com a la LOXL1, estaria controlant espacialment la polimerització d'elastina [358, 359]. No obstant, per altra banda, s'ha observat que la LOXL1 es posiciona a les fibres en formació mitjançant el seu propèptid (tot i que es desconeix per quin mecanisme), i que aquesta localització és independent de FBLN5 [339, 390]. Tot i això, sembla que la FBLN5 regula l'activitat lisil oxidasa, ja sigui directa o indirectament, ja que en la seva absència, el proenzim de LOXL1 no es proteolitza i per tant, és inactiu [339].

La FBLN5, doncs, és una proteïna indispensable per a la correcta formació de les fibres elàstiques, un procés complex finament regulat per un gran nombre de proteïnes de MEC. De fet, sembla que la síntesi de FBLN5 podria estar induïda, directa o indirectament, per la tropoelastina en les cèl·lules elastogèniques, tal i com apunten Tsuruga *et al.* (2004) [372].

INTRODUCCIÓ

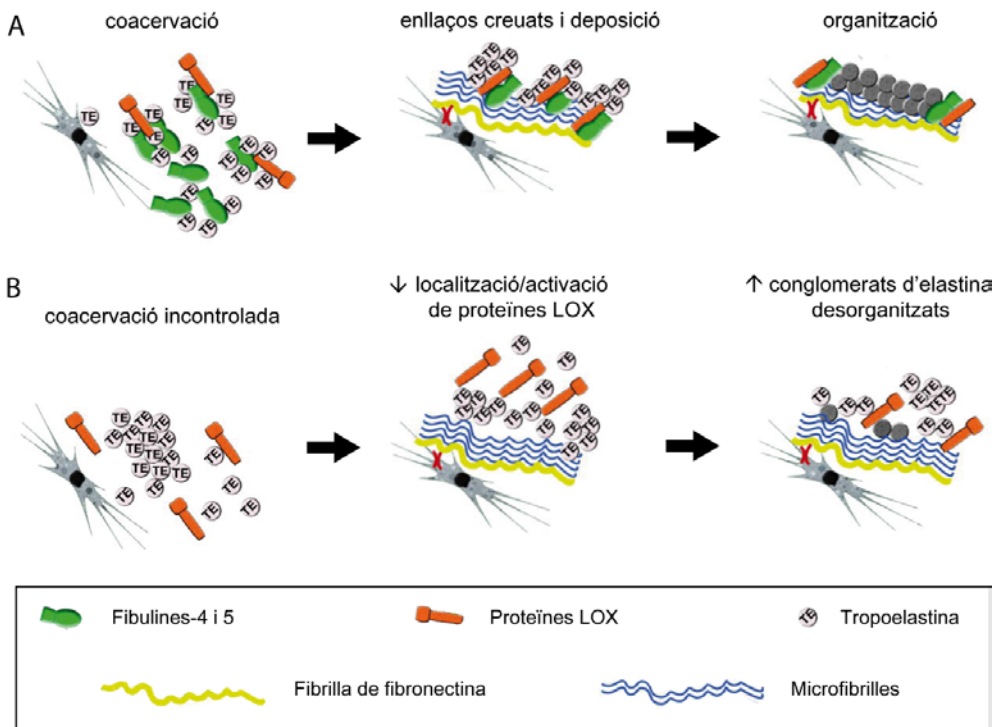


Figura 9. Model d'elastogènesi proposat per Yanagisawa *et al.* (2010). (A) Procés normal de formació de les fibres elàstiques, comprenent els passos de coacervació, enllaços creuats, deposició i organització. Les fibulines-4 i -5 regulen el procés de coacervació a la perifèria de les cèl·lules elastogèniques, amb la presència de formes inactives de les proteïnes LOX. Les fibrilles de fibronectina ancorades a les cèl·lules serveixen de motllo per a l'assemblatge de microfibrilles, les quals serveixen de motllo per a la deposició de tropoelastina (TE). Les fibulines potencien l'activació proteolítica de les proteïnes LOX, les quals inicien els enllaços creuats entre agregats de tropoelastina. Un cop polimeritzada l'elastina, és probable que les fibulines romanguin a la perifèria de les fibres elàstiques. (B) Situació hipotètica sense fibulines-4 ni -5. Els processos de coacervació i maduració no estan regulats, dificultant els enllaços creuats entre coacervats de TE. Els complexos LOX/LOXL1-TE no es poden incorporar correctament a les microfibrilles, i les proteïnes LOX no s'activen proteolíticament. El resultat són nombrosos agregats de TE i una reducció de fibres elàstiques madures. Figura adaptada de Yanagisawa *et al.* (2010) [389].

5.6. REGULACIÓ DE L'ADHESIÓ, LA PROLIFERACIÓ I LA MIGRACIÓ CEL·LULARS

A part de ser indispensable en la formació de les fibres elàstiques, la FBLN5 té la capacitat de regular la funcionalitat de les cèl·lules en funció del context i del tipus cel·lular.

La FBLN5 promou l'adhesió de **CE** i **CMLV** al substrat mitjançant la seva unió simultània a integrines (com $\alpha4\beta1$, $\alpha\nu\beta3$, $\alpha\nu\beta5$ o $\alpha9\beta1$) i a components de la MEC. En aquestes cèl·lules, la FBLN5 inhibeix la proliferació i la migració, mentre que en **fibroblasts** i **cèl·lules de fibrosarcoma** indueix aquests dos últims processos. Sorprenentment, en **cèl·lules epitelials**, la FBLN5 té propietats antiproliferatives, tot i activar vies de senyalització similars a les que activa en fibroblasts [341, 365, 367]. En **CE**, la FBLN5 promou l'adhesió mitjançant el seu domini RGD, en unir-se a integrines $\alpha\nu\beta3$, $\alpha\nu\beta5$ i $\alpha9\beta1$ [341, 344]. En models experimentals, s'ha observat que, si bé la FBLN5 no afecta l'adhesió de CE en condicions estàtiques, sí que incrementa l'adhesió d'aquestes cèl·lules a superfícies artificials en condicions d'estrès de cisalla [374].

La FBLN5 regula l'adhesió de **CMLV** a través de les integrines $\alpha5\beta1$ i $\alpha4\beta1$. L'adhesió a la FBLN5 no comporta la formació de fibres d'estrès ni d'adhesions focals, a diferència de les CMLV que creixen en fibronectina, la qual també s'uneix a les mateixes integrines. De fet, en presència de FBLN5 es bloqueja l'activació de la integrina $\beta1$ per fibronectina, atorgant a la FBLN5 un clar paper antiproliferatiu en CMLV i indicant que, si més no en CMLV, la FBLN5 actuaria com un antagonista d'integrines [365, 373]. En concordança amb aquestes observacions, cultius de CMLV provinents de ratolins deficientes per a la FBLN5 presenten unes taxes de proliferació i migració més elevades que les de ratolins silvestres en resposta al PDGF-BB [373, 391].

5.7. FBLN5 I ANGIOGÈNESI

L'**angiogènesi** és el procés pel qual es formen nous capil·lars a partir de vasos pre-existents. En adults sans, només trobem aquest fenomen en el cicle reproductiu femení i en la cicatrització. No obstant, l'angiogènesi també participa en patologies com l'aterosclerosi o el càncer.

INTRODUCCIÓ

Aquest complex procés està finament regulat, jugant-hi un paper clau el control de la síntesi/degradació de MEC. De fet, s'inicia amb un procés de degradació de MEC per tal d'assolir una matriu que permeti la proliferació, migració i morfogènesi de les CE. El remodelat de la MEC també allibera factors biològicament actius segregats per la matriu i essencials en el procés de la vasculogènesi. Finalment, la matriu torna a acoblar-se i els contactes entre cèl·lula i MEC es restableixen per tal d'estabilitzar els nous vasos acabats de formar [392-395].

Els ratolins deficientes per a la FBLN5 presenten una major ramificació a nivell vascular i dèrmic [341, 343, 396]. La MEC d'aquests animals és més permissiva a l'angiogènesi, segons un model d'invasió fibrovascular amb esponges subcutànies [397]. *In vitro*, les CE en procés de tubulogènesi presenten una menor expressió de FBLN5. A més a més, la FBLN5 inhibeix la ramificació angiogènica en CE, així com la proliferació i invasió d'aquestes cèl·lules en matrius artificials (*Matrigel*) [368]. La FBLN5, doncs, es presenta com una molècula anti-angiogènica. Alguns estudis suggereixen que aquesta activitat anti-angiogènica seria, si més no en part, responsable del paper de la FBLN5 com a supressora de tumors [398].

Sembla que la FBLN5 exerceix aquests efectes anti-angiogènics regulant l'expressió de factors pro- i anti-angiogènics per part de les CE i antagonitzant la resposta d'aquestes cèl·lules al **VEGF**. Així, en CE, la FBLN5 indueix l'expressió dels inhibidors de MMP TIMP-1 i -3 i redueix l'expressió de les MMP-2 i -3 [368]. Tanmateix, la FBLN5 i el factor pro-angiogènec VEGF es contraresten mútuament. En CE, el VEGF inhibeix l'expressió de FBLN5 induïda per TGF- β 1 [367]; mentre que la FBLN5 redueix la resposta de les CE al VEGF, alhora que n'augmenta l'expressió de trombospondina-1, un factor anti-angiogènec [368]. La trombospondina-1 inhibeix l'activació de MMP-9, de manera que en ser induïda per la FBLN5, estaria promovent la finalització del procés angiogènec [375, 399].

5.8. PATOLOGIES RELACIONADES AMB ALTERACIONS EN LA FIBULINA-5

Les conseqüències d'una "alteració" en els nivells de FBLN5 s'observen naturalment en l'**envelliment**, de forma que, en humans, la dermis presenta una disminució dels nivells de FBLN5 associada a l'edat [400]. S'ha observat que la FBLN5 pot ser fragmentada específicament per una serina proteasa, alliberant un fragment amino-terminal que conté el domini RGD, de manera que la proteïna

truncada perd la capacitat d'unir-se a microfibrilles o integrines. En la pell de ratolins, la quantitat de FBLN5 truncada augmenta amb l'edat, mentre que la de FBLN5 íntegra disminueix. Per tant, la proteòlisi de la FBLN5 podria estar involucrada en la pèrdua d'elasticitat de la pell pròpia de l'edat [358]. A nivell **patològic**, els ratolins deficients per a la FBLN5 ens donen una bona idea de com pot afectar la manca d'aquesta proteïna. Tal i com ja hem anat comentant, aquests ratolins tenen les fibres elàstiques totalment desorganitzades, fet que els provoca pell laxa, vasos sanguinis tortuosos i molt ramificats, emfisema pulmonar i prolapse genital; i de fet, s'han descrit associacions entre aquestes patologies i la FBLN5 en humans [341, 343] [348, 401]. Tanmateix, mutacions en el gen de la FBLN5 poden donar lloc a formes alterades d'aquesta proteïna o a una reducció dels seus nivells, ocasionant patologies com el síndrome de cutis laxa o la degeneració macular [402-405].

5.8.1. FBLN5 i càncer

La majoria de metàstasis humanes (ronyó, mama, ovari, pròstata, pulmó i colon) presenten nivells baixos o nuls de FBLN5 [367, 377]. La pèrdua de FBLN5 en tumors pot ser fruit de factors que n'inhibeixen l'expressió, com Myc (el producte del proto-oncogen *c-Myc*) o el VEGF [369, 370]. S'han publicat nombrosos estudis que mostren que la FBLN5 pot actuar com a **supressora de tumors**. La FBLN5 pot frenar el creixement tumoral de **cèl·lules epitelials** en controlar la ramificació angiogènica, la proliferació i la migració cel·lulars, i tot això amb un efecte apoptòtic mínim [367, 368, 398, 406]. La FBLN5 dificulta la creació d'una MEC propícia a la proliferació i migració cel·lulars en inhibir metal·loproteases de matriu com la MMP-7 en cèl·lules de càncer de pulmó [377], o la MMP-9 en fetge i pulmó [407]. La FBLN5 senyalitza aquests efectes mitjançant la seva unió a integrines via RGD.

Malgrat aquests estudis, també s'ha suggerit que la FBLN5 pot **augmentar la tumorigènesi**: en **fibroblasts** i en **cèl·lules epitelials**, la FBLN5 exerceix un efecte sinèrgic amb el TGF- β 1, augmentant-ne les respostes de creixement, motilitat i invasió cel·lulars, i induint l'EMT [367, 376].

En definitiva, el paper de la FBLN5 en el càncer encara és una mica confús i, tal i com succeeix amb altres processos regulats per la FBLN5, varia en funció del context i del tipus cel·lular.

INTRODUCCIÓ

5.8.2. FBLN5 i malalties cardiovasculars

Ja hem comentat àmpliament la importància que té la FBLN5 en el desenvolupament i manteniment dels vasos sanguinis i en la homeòstasi de les cèl·lules vasculares. Les anomalies vasculares observades en els ratolins *Fbln5*^{-/-} (aortes tortuoses, disteses, fràgils i sense capacitat de resiliència, malformacions en l'arbre vascular, vasos excessivament ramificats i pressió arterial elevada) suggereixen la importància d'aquesta proteïna en el control del remodelat vascular [341, 343].

Tal i com hem comentat anteriorment, l'expressió de la FBLN5 en vasos adults és molt baixa, excepte en l'úter i en aquells punts que, per qüestions hemodinàmiques, són més propensos a patir lesions ateroscleròtiques, com per exemple els punts de ramificació intercostal de l'aorta toràcica [408, 409]. Mitjançant l'ús de models animals susceptibles al desenvolupament d'aterosclerosi (models murins *LDLR*^{-/-} i *LDLR*^{-/-}/*Tg:apoB*^{+/+}) i models d'inducció de lesió per baló en artèria caròtida i aorta de rata, s'ha pogut observar que l'expressió de la FBLN5 s'activa fortament en les **lesions vasculares**. La FBLN5 també s'indueix en la vasculatura pulmonar sotmesa a hiperòxia. Aquests increments dels nivells de la FBLN5 es produeixen, però, en els darrers estadis de remodelat de MEC, coincidint amb l'aturada de la proliferació de CMLV [340, 344, 410]. En concordança amb aquestes observacions, els ratolins deficientes per a la FBLN5 sotmesos a lligadura de caròtida desenvolupen un remodelat vascular exagerat comparat amb els animals normals [373]. Per tant, tenint en compte aquests resultats, i que la FBLN5 té la capacitat d'inhibir la proliferació i la migració de CE i CMLV, tot indica que la seva reactivació en els darrers estadis de les lesions vasculares contraresta la proliferació de CMLV, donant a la FBLN5 un paper resolutiu i protector en aquestes lesions.

Tanmateix, la FBLN5 podria estar modulant l'estat redox a la paret vascular a través de la seva unió a la **superòxid dismutasa extracel·lular (SOD3)**, la qual regula els nivells d'ió superòxid (O_2^-). Els ratolins deficientes per a la FBLN5 mostren nivells més elevats de O_2^- a l'aorta respecte als ratolins silvestres, així com nivells superiors de SOD3 circulants. Aquests resultats suggereixen que, en absència de FBLN5, la SOD3 no queda retinuda a la paret arterial, fet que explicaria l'increment de O_2^- al teixit vascular [364]. Finalment, en models animals d'aterosclerosi i de lesió arterial per baló s'ha observat un fort increment de SOD3 i FBLN5 a la paret vascular [340, 344, 411], fet que podria interpretar-se com un efecte compensatori o reparador de la

lesió. El control dels nivells de ROS per la FBLN5 es produiria a través d'un mecanisme dependent de les integrines $\beta 1$ [412].

La FBLN5, tal i com hem vist, és una proteïna multifuncional implicada en múltiples aspectes de la homeòstasi vascular i íntimament relacionada amb la LOX. Tot i que des del seu descobriment s'ha avançat molt en el seu coneixement, el paper de la FBLN5 en el control de la funcionalitat vascular no s'ha caracteritzat en profunditat.

OBJECTIUS

La Lisil Oxidasa i la Fibulina-5 són dues proteïnes de matriu extracel·lular essencials en la formació i manteniment de les fibres elàstiques. Ambdues participen en processos fisiopatològics caracteritzats per l'alteració de l'equilibri síntesi/destrucció de la matriu extracel·lular i, en relació al sistema cardiovascular, han estat involucrades en el remodelat vascular. Estudis en models experimentals han proporcionat indicis sobre la possible vinculació d'aquestes proteïnes en el desenvolupament d'aterosclerosi i de l'aneurisma d'aorta abdominal, si bé existeixen molts aspectes sorprenents en la biologia d'aquestes proteïnes que haurien de ser analitzats en profunditat.

Un aspecte crític en el remodelat vascular associat a la progressió de la lesió ateroscleròtica és l'aparició de regions d'hipòxia. L'estrès hipòxic és característic d'alguns processos fisiològics, però també de patologies com el càncer, els trastorns isquèmics, la inflamació crònica i l'aterosclerosi. Les cèl·lules endotelials són sensors primaris d'aquest estrès hipòxic, i la seva adaptació a la hipòxia es produeix a través d'una complexa resposta finament regulada que afecta múltiples aspectes de la seva biologia, entre ells la supervivència cel·lular, el control del to i la permeabilitat vascular, el remodelat de la matriu extracel·lular i l'angiogènesi.

Si bé s'ha descrit la regulació de LOX per hipòxia en cèl·lules tumorals, poc es coneix respecte a l'efecte de l'estrès hipòxic sobre l'expressió d'aquest enzim a la paret vascular i, més concretament, en cèl·lules endotelials. La capacitat d'aquest enzim per controlar l'expressió gènica, en base a la seva activitat en nucli, i per regular l'activitat de factors de creixement fonamentals en l'homeòstasi vascular, com el bFGF i el PDGF, evidencia el caràcter multifuncional de la LOX i indica que aquest enzim pot regular de manera crítica la funció vascular. Respecte a la FBLN5, si bé s'ha descrit el seu paper en el control de l'angiogènesi, no s'ha establert la possible regulació per hipòxia d'aquesta proteïna que, a través de la seva interacció amb integrines, pot alterar profundament la resposta cel·lular.

En base a aquests antecedents, ens hem plantejat com a **hipòtesis** de treball que la LOX i la FBLN5 són proteïnes clau en l'homeòstasi vascular, participen en la resposta adaptativa de les cèl·lules vasculares a la hipòxia i contribueixen al desenvolupament de patologies vasculares com l'aterosclerosi i l'aneurisma d'aorta abdominal.

OBJECTIUS

En aquest context, ens hem plantejat els següents **objectius**:

1. Analitzar els mecanismes involucrats en la regulació de la LOX per hipòxia en cèl·lules endotelials.
2. Estudiar l'efecte de la LOX sobre l'expressió gènica de les cèl·lules vasculars.
3. Generar un animal transgènic que sobre-expressi LOX en CML com a eina per a determinar el paper d'aquest enzim en el desenvolupament de malalties cardiovasculars.
4. Caracteritzar els mecanismes de regulació de la FBLN5 per hipòxia en cèl·lules endotelials i determinar el seu significat fisiopatològic.
5. Identificar vies implicades en el desenvolupament de l'aneurisma d'aorta abdominal i analitzar la regulació de LOX i FBLN5 en aquesta patologia.

MATERIAL I MÈTODES

Per tal d'agilitzar la lectura d'aquest apartat, les composicions de medis de cultiu i solucions, així com les referències d'anticossos, sondes per PCR en temps real o inhibidors, es detallen a l'*Apèndix 1*.

1. OBTENCIÓ DE MOSTRES DE PACIENTS

Es van recollir mostres de paret abdominal d'aorta aneurismàtica de pacients amb AAA amb elevat risc de ruptura (diàmetre de l'aorta > 5-5,5 cm) diagnosticats i intervinguts al Servei de Cirurgia Vasculardel Hospital de la Santa Creu i Sant Pau per cirurgia oberta convencional. Com a controls, es van recollir mostres d'aorta no aneurismàtica provinents de donants d'òrgans, gràcies a la col·laboració del Servei de Trasplantaments del mateix hospital. Tant els pacients com els familiars dels donants van signar un document de consentiment informat autoritzant l'ús de les biòpsies o necròpsies amb finalitats científiques.

2. EXPERIMENTACIÓ ANIMAL

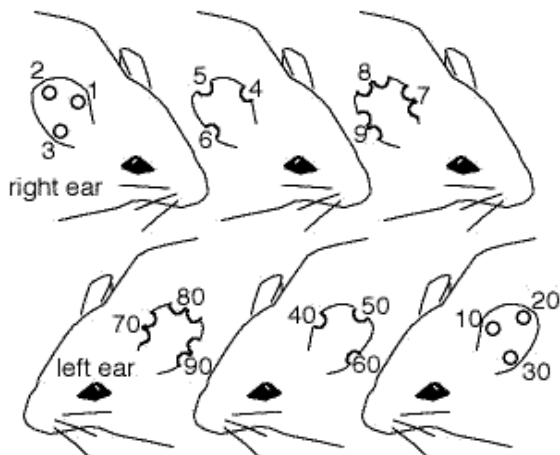


Figura 11. Sistema d'identificació dels ratolins.

2.3. TRACTAMENT D'HIPÒXIA

Es van exposar a hipòxia ratolins mascles de la soca C57BL/6J (Charles River) de 2 mesos d'edat mitjançant una mescla de gas al 10% de O₂ balancejat amb N₂ (Abelló Linde). Per tal d'estabular els animals en aquestes condicions durant el temps necessari (24-48 h), va caldre dissenyar una gàbia tenint en compte que els animals havien de poder accedir lliurement a l'aigua i l'aliment però no havien de poder obstruir ni l'entrada ni la sortida de gasos (Fig. 14). Es va determinar el flux d'entrada adequat per tal de garantir un nivell de O₂ constant que es controlava mitjançant una sonda de gasos (*Anagas CD98 Plus*, Bacharach). Per evitar l'acumulació del CO₂ exhalat pels animals, es va col·locar un absorbent de CO₂ (*Medisorb*, GE Healthcare) dins la gàbia, però fora de l'abast dels ratolins. Durant l'estabulació dels animals es van comprovar els nivells de O₂ i CO₂ regularment.

Els animals es van sotmetre a hipòxia respiratòria durant 24 o 48 h. Un cop transcorregut aquests temps d'hipòxia, els animals es van anestesijs amb ketamina (150 mg/kg) i medetomidina (1 mg/kg) i es van sacrificar. Els òrgans extrets es van congelar ràpidament en nitrogen líquid i es guardaren a -80°C fins al moment d'extreure'n l'ARN.



Figura 14. Gàbia dissenyada per a mantenir els ratolins en condicions d'hipòxia. Les fletxes blanques indiquen el sentit d'entrada i sortida dels gasos. La punta de fletxa groga assenyalava la ubicació de l'absorbent de CO₂.

2.4. MANIPULACIÓ I SUPERVISIÓ DELS ANIMALS

2.4.1. Manipulació i manteniment dels animals

Els ratolins es van mantenir en cicles de 12 h llum / 12 h obscuritat a una temperatura de $21 \pm 1^\circ\text{C}$. Els ratolins s'alimentaren *ad libitum* amb una dieta comercial estàndard (2014C Teklad Global 14% Protein Rodent Maintenance Diet, Harlan Iberica SL). La manipulació i sacrifici dels animals es va realitzar segons les directrius establertes per l'*American Physiological Society for Animal Research*. Tots els procediments experimentals han estat aprovats pel Comitè d'Ètica del *Centro de Investigación Cardiovascular*, tal i com s'estipula a la llei 5/1995 del 21 de juny aprovada per la Generalitat de Catalunya.

MATERIAL I MÈTODES

2.4.2. Procediment de supervisió del benestar animal

El benestar dels animals es va supervisar sota els següents paràmetres estandarditzats:

A. Pèrdua de pes

- 0) Pes normal.
- 1) Menor del 10%.
- 2) Entre un 10 i un 15%.
- 3) Consistent o ràpida, superior a un 20% mantinguda durant 72 h.

B. Aspecte físic

- 0) Normal.
- 1) Deshidratació, aprimament. Canvis en el color de la pell.
- 2) Pèl "no brillant" o "despentinat". Pal·lidesa. Cianosi.
- 3) Encorbament. Pèrdua de massa muscular (emaciació).

C. Manifestacions clíniques

- 0) Cap.
- 1) Hipotèrmia.
- 2) Secrecions mucoses i/o sanguinolentes per qualsevol orifici. Diarrea.
- 3) Distensió abdominal. Volum de líquid ascític superior al 10% del pes corporal inicial.
Respiració dificultosa (particularment si va acompanyada de descàrrega nasal i/o cianosi).

D. Alteracions en la conducta

- 0) Cap.
- 1) Incapacitat de moure's amb normalitat.
- 2) Impossibilitat d'arribar al menjar/beguda. Aïllament de la resta dels animals de la gàbia.
- 3) Inconscient o comatós. Intenció "d'amagar-se" en la viruta, manca de resposta a estímuls.

E. Ferides

- 0) Cap.
- 1) Esgarrapades.
- 2) Ferides que no cicatritzen.
- 3) Ferides ulcerades que fins i tot poden supurar.

Si es dona la circumstància que hi hagi més d'un paràmetre amb un valor de 3, automàticament tots els 3 passaran a 4. La puntuació obtinguda s'interpreta tal i com s'indica a continuació:

- De 0 a 5 punts: Normalitat.
- De 6 a 10 punts: Possible existència de dolor o angustia. Cal plantejar-se l'ús d'analgèsia.
- De 11 a 15 punts: Utilització obligatòria d'analgèsia. Cal plantejar-se el sacrifici de l'animal.
- De 16 a 20 punts: sacrifici obligatori de l'animal.

Tots els animals van obtenir puntuacions inferiors a 5. No obstant, en les primeres hores de recuperació de la intervenció de lligadura de caròtida, s'administraren dosis de record d'atipamezol en casos d'hipotèrmia perllongada o de dificultats de moviment. En els experiments d'hipòxia, no es va poder controlar ni el pes ni la temperatura corporal.

3. CULTIUS CEL·LULARS

En els nostres estudis s'han utilitzat cultius de cèl·lules vasculares. S'ha treballat amb cèl·lules endotelials de diferent origen, humanes de vena de cordó umbilical (**HUVEC**), d'aorta bovina (**BAEC**, Clonetics) i de pulmó de ratolí (**MLEC**). També s'ha treballat amb **CMLV** humanes i murines, així com amb les línies cel·lulars **HeLa** o **HEK 293T**.

Totes les cèl·lules es van cultivar a 37°C i 95% d'humitat en condicions de normòxia (21% O₂, 5% CO₂). Segons els casos, i després d'assolir un 80% de confluència, les cèl·lules es van mantenir en medi de quiescència i es van sotmetre a hipòxia (1% O₂ i 5% CO₂, equilibrat amb N₂) a diferents temps. Per tal de mantenir un estoc de cèl·lules, aquestes es van congelar en FBS (sèrum fetal boví) al 7,5% de DMSO, a una densitat de 10⁶ cèl·lules/ml.

3.1. CULTIU PRIMARI DE CÈL·LULES ENDOTELIALS

Els estudis amb CE es van realitzar preferentment en HUVEC. No obstant, degut a la baixa eficiència de transfecció amb liposomes d'aquestes cèl·lules, els estudis de transfecció transitòria per a l'anàlisi de l'activitat transcripcional es van realitzar amb BAEC. En alguns estudis també es van fer servir MLEC.

Aquestes cèl·lules es sembraren en plaques prèviament tractades amb gelatina (de tipus B de pell bovina, Sigma) a l'1% per tal de facilitar-ne l'adherència. Les plaques o flascons s'incubaren amb un excés de gelatina a 37°C durant un mínim de 30 minuts. Després de retirar la gelatina, les plaques es rentaren 2 cops amb PBS. Seguidament s'hi sembraren les cèl·lules prèviament descongelades o tripsinitzades, amb el medi de cultiu pertinent. Les tripsinitzacions es van realitzar amb una solució de tripsina (0,2%) i EDTA (0,02%). Per a la majoria d'experiments es van sembrar 10.000 cèl·lules/cm². Tots els estudis amb CE es realitzaren entre els passatges 3 i 5.

MATERIAL I MÈTODES

3.1.1. Obtenció i cultiu primari de MLEC

Els ratolins es van sacrificar per dislocació cervical i se'ls van extreure els pulmons. Treballant en campana de flux laminar, s'eliminà tot el teixit no pulmonar i les zones amb molta sang. El teixit que en va restar es va disgregar, primer mecànicament amb unes tisores, i després enzimàticament amb col·lagenasa. Els pulmons provinents d'un ratolí s'incubaren en 10 ml de medi RPMI (Gibco) al 0,1% de col·lagenasa A (Roche) a 37°C en agitació durant 1 h. Seguidament, el teixit es disgregà amb una xeringa (14G) fins assolir un homogenat, que es va filtrar amb un filtre de 70 µm de porus i es va centrifugar a 200xg durant 5 min. El precipitat es rentà amb 8 ml de medi DMEM:F12 (Fisher Bioblock) al 20% de FBS i es tornà a centrifugar. Finalment, el precipitat es resuspengué en medi complet (15 ml/teixit provinent de 3 ratolins) i es sembrà en un flascó (75 cm²) prèviament gelatinitzat. L'endemà, les cèl·lules es rentaren dos cops amb solució de Hanks (HBSS, Gibco) per tal d'eliminar-ne els leucòcits i es deixaren 4 dies en medi complet.

Les MLEC s'immuno-aïllaren per selecció amb boles magnètiques (*Dynabeads*) conjugades a un anticòs per ICAM2. Per a l'aïllament d'un flascó de 75 cm² s'utilitzaren 10 µl de boles magnètiques, les quals es rentaren 3 cops amb 1 ml de PBS al 2% de FBS amb l'ajuda d'un imant (*Magnetic holder*, MPC-S Dynal). A continuació, es resuspengueren en 500 µl de PBS al 2% de FBS, se'ls hi afegiren 5 µg d'anticòs contra CD102 (ICAM-2) (BD Biosciences) i s'incubaren durant 2 h a 4°C en rotació. Les boles amb l'anticòs conjugat es van rentar seguint el mateix procediment, i es van resuspendre en PBS. Els flascons s'incubaren a 4°C durant 5 min, just abans d'afegir-hi els 250 µl de boles amb anticòs, i tot plegat s'incubà a 4°C en agitació suau durant 1 h. Passat aquest temps, les cèl·lules es van rentar amb HBSS, es van tripsinitzar i es van resuspendre en 500 ml de medi complet. Les CE amb les boles magnètiques unides es van separar de la resta mitjançant l'imant i columnes de separació (*Mini Macs Separation Columns*, Miltenyi Biotec). Finalment, les cèl·lules es sembraren en un flascó de 25 cm² prèviament gelatinitzat i s'hi van deixar créixer 7 dies abans de canviar-les-hi el medi. Les cèl·lules es tripsinitzaren en arribar a confluència.

3.2. CULTIU PRIMARI DE CÈL·LULES MUSCULARS LLISES VASCULARS (CMLV)

3.2.1. Obtenció i cultiu primari de cèl·lules musculars murines d'aorta (CMLVm)

Els ratolins es sacrificaren per dislocació cervical i, amb l'ajuda d'una lupa binocular, es va exposar l'aorta i es va obrir longitudinalment des de la crossa aòrtica fins a les ilíaqes. La cara luminal de l'aorta es va raspar lleument amb unes pinces per tal d'eliminar-ne les CE. Seguidament, es va separar la capa mitjana de l'adventícia, es va rentar amb sèrum fisiològic i se seccionà en petits segments (explants) d'aproximadament 1 mm². A continuació, els explants procedents de 4 aortes s'incubaren en 7 ml de medi DMEM (Gibco) amb col·lagenasa del tipus I (Gibco) (150 U/ml) a 37°C en agitació durant 15 min. Els fragments digerits es centrifugaren (2 min a 2000xg) i es sembraren en 2 ml de medi (DMEM al 20% de FBS, 1% d'antibiòtics i 1% de fungizona) en un flascó de 25 cm². Els explants es van deixar en el flascó durant una setmana aproximadament, temps durant el qual les cèl·lules van anar migrant dels explants i proliferant.

Les CMLVm es van tripsinitzar amb una solució de tripsina (0,05%) i EDTA (0,02%) (Gibco). Un cop resuspesos en medi, les cèl·lules i els explants, es van deixar reposar una estona per tal que els explants caiguessin per gravetat. El sobrenedant amb cèl·lules es va recollir i centrifugar per tal d'eliminar-ne la tripsina, obtenint el que anomenem passatge 1. Els explants es van tornar a resuspendre en 2 ml de medi i es van sembrar en un flascó de 25 cm² per tal d'obtenir-ne més cèl·lules.

3.2.2. Cultiu primari de CMLV humanes

Les CMLV humanes utilitzades en aquest estudi provenien d'aortes de pacients trasplantats de cor a la Unitat de Transplantament Cardíac de la Divisió de Cardiologia i Cirurgia Cardíaca de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Les cèl·lules es van obtenir al nostre laboratori mitjançant una tècnica d'explants similar a la utilitzada per obtenir CMLVm [415]. Les cèl·lules es van utilitzar fins al passatge 6.

MATERIAL I MÈTODES

3.3. CULTIU DE LÍNIES CEL·LULARS

Segons l'estudi, s'empraren línies cel·lulars d'origen epitelial **HeLa** (derivades de càncer de cèrvix humà) o **HEK 293T** (derivades de ronyó embrionari humà), que es cultivaren segons les especificacions de l'ATCC (American Type Culture Collection).

4. CLONATGE, AMPLIFICACIÓ I PURIFICACIÓ D'ADN PLASMÍDIC

En aquest estudi s'han realitzat diversos clonatges amb diferents objectius, els quals s'expliquen en els apartats dels procediments experimentals corresponents. En aquest apartat s'exposen els trets generals de la tècnica de clonatge.

4. 1. OBTENCIÓ DE LA SEQÜÈNCIA A CLONAR (INSERT)

Segons el cas, aquesta es va dur terme de dues maneres:

a. Per amplificació per PCR, realitzada amb oligonucleòtids encebadors que contenen dianes de restricció. Les amplificacions es realitzaren amb la polimerasa d'alta afinitat PfU DNA *polymerase* (Fermentas) per tal de minimitzar la possibilitat d'aparició de mutacions. Els productes amplificats es purificaren amb el *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen) i es digeriren segons les dianes de restricció introduïdes en els oligonucleòtids encebadors utilitzats per a l'amplificació.

b. Per digestió a partir d'una construcció prèvia. Els productes digerits es separaren per electroforesi en gel d'agarosa i es purificaren amb el *QIAquick Gel extraction Kit* (Qiagen).

4.2. DIGESTIÓ I DEFOSFORILACIÓ DEL PLASMIDI RECEPTOR DE L'INSERT

Per tal de generar extrems cohesius on clonar els inserts, els plasmidis es van digerir amb els enzims de restricció pertinents, es van purificar en gel d'agarosa i els extrems 5' lliures generats es van defosforilar per tal de minimitzar el risc de

relligació del plasmidi sense incorporació d'insert. Es va utilitzar la fosfatasa alcalina CIAP (0,001 U per 10 µg de plasmidi; *Calf Intestinal Alkaline Phosphatase*, Invitrogen).

4.3. LLIGACIÓ

La lligació de l'insert en el vector d'interés es va realitzar amb la *T4 DNA Ligase* (1 U/ 10 µl de reacció Fermentas), incloent 25 -50 ng de vector i una quantitat d'insert que, seguint una proporció molar de insert:plasmidi de 3:1, es calculà segons la fórmula:

$$(\text{ng plasmidi} \times \text{kb insert}) / \text{kb vector} \times 3 = \text{ng insert}$$

4.4. TRANSFORMACIÓ

Per tal d'amplificar i seleccionar les construccions generades, les lligacions es van transformar en bacteris competents tal i com s'indica en els següents apartats.

4.4.1. Preparació de bacteris competents

Aquest mètode va ser descrit per Hanahan el 1985 [416]. En primer lloc es féu un precultiu d'*E. coli* (soca DH5α) inoculant 10 µl d'una reserva de bacteris congelats a -80°C en 10 ml de medi LB en un tub de 50 ml, que es va deixar en agitació a 37°C tota la nit. L'endemà, s'inocularen 2 ml del precultiu saturat en 50 ml de medi SOB a 10 mM MgSO₄ (en un *Erlenmeyer* de 250 ml), que s'incubà en agitació orbital a 37°C fins que s'assolí una absorbància de 0,5 a una longitud d'ona de 650 nm. Aleshores, el cultiu es va transferir a un tub de 50 ml i es va deixar refredar de 10 a 15 min en gel. Seguidament, es centrifugà a 1000xg a 4°C durant 12 min, i el precipitat que en va resultar es resuspengué en 16 ml de solució RF1 i s'incubà 15 min en gel. La solució es va centrifugar a 1000xg a 4°C durant 12 min i el precipitat de bacteris es resuspengué en 4 ml de la solució RF2 i s'incubà durant 15 min en gel. Finalment, s'hi va afegir un 15% de glicerol i els bacteris es van congelar en alíquotes de 200 µl submergint -les en N₂ líquid. Els bacteris, llestos per ser transformats, es van conservar a -80°C fins al seu ús.

MATERIAL I MÈTODES

4.4.2. Transformació de bacteris competents amb ADN plasmídic

Les transformacions es van realitzar per xoc tèrmic. Els bacteris competents es van descongelar en gel durant uns 20 min. A continuació, s'hi va afegir l'ADN a transformar (5 µl de lligació, 1 µl de producte de mutagènesi o 1 ng de vector) i es van incubar en gel durant 30 min. Transcorregut aquest temps, se sotmeteren a un xoc tèrmic de 60 seg a 42°C, seguit de 5 min en gel. Els bacteris es van recuperar amb 800 µl de medi SOC i es van incubar a 37°C en agitació durant 1 h. Seguidament, es van centrifugar a temperatura ambient (1000xg, 1 min), es van resuspendre en 100 ml de SOC i es van sembrar en LB-agar amb l'antibiòtic adequat per a la selecció. Les plaques s'incubaren a 37°C tota la nit.

4.4.3. Comprovació dels clons

Passades unes 16 h, es va comprovar la presència de colònies i les plaques es van guardar a 4°C fins el seu ús per tal d'evitar la l'aparició de colònies satèl·lits per esgotament de l'antibiòtic de selecció. Les colònies es van picar individualment i s'inocularen en 3 ml de medi LB amb l'antibiòtic de selecció pertinent. El precultiu es va deixar créixer a 37°C i en agitació tota la nit. L'endemà s'utilitzaren 2 ml de cada precultiu per fer una preparació d'ADN plasmídic (*Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System*, Promega) i comprovar si les construccions eren correctes mitjançant anàlisis de restricció i/o amplificació per PCR. El ml restant es reservà a 4°C.

4.4.4. Purificació d'ADN plasmídic

Un cop identificats els clons correctes, a partir del precultiu reservat es va fer una sembra en estria en LB-agar amb antibiòtic. Es van deixar créixer tota la nit a 37°C i l'endemà s'inoculà una única colònia aïllada en 5 ml de medi LB amb antibiòtic, i es va fer créixer a 37°C en agitació durant tot el dia. A última hora del dia, s'inocularen 100 µl del precultiu en 100 ml de medi LB i antibiòtic en un *Erlenmeyer* de 500 ml. El cultiu s'incubà a 37°C en agitació durant tota la nit. L'endemà, es va recuperar 1 ml de cultiu per preparar un glicerolat (20% glicerol), que es va guardar a -80°C. La resta es va centrifugar a 3200xg a 4°C durant 15 min i el precipitat s'utilitzà per extreure'n ADN plasmídic mitjançant el *QIAfilter Plasmid Midi Endotoxin Free kit* (Qiagen). L'ADN plasmídic obtingut es va comprovar mitjançant electroforesi, anàlisi de restricció, PCR i/o seqüenciació.

5. ANÀLISI D'ACTIVITAT TRANSCRIPCIONAL

La regulació de l'activitat transcripcional de LOX i FBLN5 en resposta a hipòxia s'analitzà mitjançant transfecció transitòria en CE de vectors que contenen el promotor d'aquests gens acoblats a luciferasa. Estudis de deleccions seriadades i mutagènesi dirigida van permetre acotar les regions implicades en aquesta resposta.

5.1. GENERACIÓ DE LES CONSTRUCCIONS

Els promotors de LOX i FBLN5 es van amplificar per PCR a partir d'ADN genòmic humà. Els paràmetres de reacció de PCR s'optimitzaren segons les característiques dels oligonucleòtids encebadors i la mida del fragment a amplificar. Els productes de PCR es purificaren i es van digerir gràcies a les dianes de restricció incorporades als oligonucleòtids utilitzats per l'amplificació. A continuació, es van clonar en el plasmidi reporter per a la luciferasa pGL3-Basic (Promega).

5.1.1. Construccions del promotor de LOX

Partint d'ADN genòmic, es van amplificar 1004 pb contenint un fragment del promotor de la LOX humana (posicions -821 a +83, segons el primer codó d'inici de traducció ATG) i es van clonar en el vector pGL3-Basic usant les dianes de restricció *KpnI* i *HindIII*, obtenint el plasmidi pGL3/pLOX-821. A partir d'aquesta construcció es van generar dues deleccions seriadades per amplificació per PCR, obtenint les construccions pGL3/pLOX-405 i pGL3/pLOX-132. Els oligonucleòtids encebadors usats en cada cas han estat els següents:

Oligonucleòtids encebadors per generar les construccions del promotor de LOX		Dianes
Sentit pLOX-821	5'-CTCATGGTACCTACACACAGAAAAAC-3'	<i>KpnI</i>
Sentit pLOX-405	5'-CTCATGGTACCAGGAGCTGTCCGCC-3'	<i>KpnI</i>
Sentit pLOX-132	5'-ACTGAGGTACCCGTGCTCCGCTCGCC-3'	<i>KpnI</i>
Antisentit comú	5'-GGGCTAAGCTTGGCCGGCGGGGAGGGG-3'	<i>HindIII</i>

Les dianes de restricció es mostren subratllades.

MATERIAL I MÈTODES

5.1.2. Construccions del promotor de FBLN5

Seguint la mateixa metodologia que la indicada en 5.1.1, es va obtenir una construcció per al promotor de FBLN5 a partir d'ADN genòmic (pGL3/pFBLN5-1650, posicions -1650 a +17), i dues delecions seriades a partir de la primera (pGL3/pFBLN5-635 i pGL3/pFBLN5-329), utilitzant els següents oligonucleòtids:

Oligonucleòtids encebadors per generar les construccions del promotor de FBLN5		Dianes
Sentit pFBLN5-1650	5'- TTAAGGTACCCCTTTGGTTGCCCTTACTTTATT-3'	<i>KpnI</i>
Sentit pFBLN5-635	5'-GAGTTCGGTACCCCTTTCCTTCCGGAGGCCGA-3'	<i>KpnI</i>
Sentit pFBLN5-329	5'-TGTAATCGGTACCAGCTGTGTCCAGACTG-3'	<i>KpnI</i>
Antisentit comú	5'-TAACTCGAGGTCCAAGACGCGCAGGAGGAGATGCGAA-3'	<i>XhoI</i>

Les dianes de restricció es mostren subratllades.

5.2. ANÀLISI DE SEQÜÈNCIES

Les seqüències dels diferents promotors s'analitzaren mitjançant el programa *MatInspector* (Genomatix) per tal d'identificar-hi elements putatius d'unió de factors de transcripció a l'ADN.

5.3. MUTAGÈNESI DIRIGIDA

La mutagènesi dirigida permet determinar la funcionalitat d'un element de resposta mitjançant la modificació de la seva seqüència nucleotídica. Els possibles HRE presents en els promotors de FBLN5 i LOX es van mutagenitzar per PCR utilitzant el *QuikChange™ II Site-Directed Mutagenesis kit* (Stratagene). Els oligonucleòtids encebadors usats per mutagenitzar es van dissenyar amb l'ajuda del programa *QuikChange® Primer Design* (Stratagene). Les noves seqüències introduïdes es van analitzar *in silico* (*MatInspector*) per descartar que no generessin cap nou element.

Els elements putatius de resposta a hipòxia presents en el promotor de LOX en la posició -75 i en el promotor de FBLN5 en -78 es van mutagenitzar en les construccions pGL3/pLOX-821 i pGL3/pFBLN5-329, respectivament. Les bases nucleotídiques es van canviar segons el patró descrit per Eler et al. [219]:

Oligonucleòtids usats en les mutagènesis dirigides

LOX sentit	5'-GGTTGAAGATTTCTCCTTCCCTC <u>ttt</u> TGATTTGAGCC CCG-3'
LOX antisentit	5'- CGGGGCTCAAAT <u>CAaaa</u> GAGGGAAGGAGAAATCTT CAACC-3'
FBLN5 sentit	5'-CAGAGGAGGCCG <u>ttt</u> TGCCCGAGCTCCTCC-3'
FBLN5 antisentit	5'-GGAGGAGCTCGGG <u>CAaaa</u> CGGCCTCCTCTG-3'

S'han subratllat els elements putatius. Les minúscules indiquen els canvis introduïts.

5.4. TRANSFECCIÓ TRANSITÒRIA I ASSAIG DE LUCIFERASA

Per tal de determinar l'activitat dels promotors de LOX i de FBLN5, es van transfectar BAEC amb les construccions descrites anteriorment, juntament amb el plasmidi pSV β -gal (Promega), que codifica per la β -galactosidasa, com a control d'eficiència de transfecció. Segons l'experiment, les construccions reporter es van co-transfectar amb vectors de sobre-expressió de proteïnes Smad o de HIF-1 α (proveïts generosament pel Dr. J. Yanagisawa [Universitat de Tsukuba, Japó] i pel Dr. L. E. Huang [Laboratory of Human Carcinogenesis, NCI, National Institute of Health, Bethesda, MD], respectivament), o pel vector buit corresponent (pcDNA3).

Les BAEC es van sembrar en plaques de 6 pous (120.000 cèl·lules/pou), i es transfectaren passades 24 h. Per cada pou de 6, s'incubaren 1 μ g de la construcció en pGL3, 0,3 μ g de pSV β -gal i, segons el cas, 1 μ g de vector d'expressió per a les proteïnes Smad, HIF-1 α o el seu corresponent plasmidi buit, juntament amb 3 μ l de *Lipofectin*[®] *Reagent* (Invitrogen), en medi Opti-MEM[®] I (Gibco) sense sèrum ni antibiòtics. Els complexos ADN/liposoma s'incubaren amb les cèl·lules durant 7 h, i passat aquest temps el medi es va substituir per medi complet. Després de 24 h en condicions de cultiu normals, les BAEC es mantingueren en condicions de normòxia o hipòxia durant 18-24 h més, i es lisaren amb 250 μ l de tampó de lisi RLB (*Reporter Lysis Buffer*, Promega). Els lisats es van congelar en N₂ líquid i es van descongelar per tal d'optimitzar-ne la lisi. L'activitat luciferasa es va detectar mitjançant el *Luciferase Assay System* (Promega) i el luminòmetre *Orion I* (Berthold Detection Systems). Els resultats es van normalitzar per l'activitat β -galactosidasa, mesurada amb el *β -Galactosidase Enzyme Assay System* (Promega).

MATERIAL I MÈTODES

6. SOBRE-EXPRESSIONIÓ PROTEICA EN CÈL·LULES EN CULTIU

6.1. TRANSFECCIÓ TRANSITÒRIA DE CÈL·LULES HeLa

Es sembraren cèl·lules HeLa en plaques de 100 mm de diàmetre ($1,65 \cdot 10^6$ cèl·lules/placa) i, passades 24 h, s'incubaren amb els complexos ADN/liposoma formats amb 8 μ g de plasmidi d'expressió de HIF-1 α (pHIF-1 α) o bé el plasmidi buit (pcDNA3) i 32 μ l de *LipofectamineTM Reagent* (Invitrogen) per placa, en medi Opti-MEM® I sense sèrum ni antibiòtics. Passades 3 h, el medi de transfecció es substituï per medi complet. Les cèl·lules s'utilitzaren per obtenir-ne extractes nuclears 40 h després de la transfecció.

6.2. SOBRE-EXPRESSIONIÓ MITJANÇANT TRANSDUCCIÓ LENTIVIRAL

6.2.1. Clonatge de LOX en el vector lentiviral

Per tal d'estudiar l'efecte de la sobre-expressió de LOX en HUVEC, es va clonar l'ADNc de la LOX humana en el vector d'expressió lentiviral pLVX-Puro, i se'n produïren partícules lentivirals mitjançant el sistema *Lenti-XTM Lentiviral Expression System* (Clontech). Aquest mètode permet la integració dels transgens al genoma de les cèl·lules infectades. Com a controls, també s'obtingueren lentivirus a partir del vector pLVX-Puro buit o amb l'ADNc de la proteïna verda fluorescent (GFP).

L'ADNc de la LOX humana es va amplificar a partir del vector pBlueScript-LOX mitjançant els oligonucleòtids encebadors indicats a continuació, i es va clonar en el vector pLVX-Puro en *Bam*HI.

Oligonucleòtids encebadors per a amplificar l'ADNc de la LOX humana		Dianes
Sentit	5'-CAAAGGATCCATGCGCTTCGCCTGGACCG	<i>Bam</i> HI
Antisentit	5'-GCTTGGATCCCTAATACGGTGAAATTGTGCAGCC-3'	<i>Bam</i> HI

Les dianes de restricció es mostren subratllades.

6.2.2. Producció de lentivirus

Com a cèl·lules empaquetadores de partícules víriques s'utilitzaren cèl·lules HEK 293T, les quals es sembraren en plaques de 100 mm de diàmetre ($4 \cdot 10^6$

cèl·lules/placa). L'endemà, les cèl·lules es transfectaren amb els plasmidis pLVX corresponents mitjançant fosfat de calci, segons les especificacions del *Lenti-X™ Lentiviral Expression System* (Clontech), juntament amb una mescla de plasmidis proveïda pel *kit*, els quals codifiquen per les proteïnes víriques necessàries per a la producció de virus. Amb aquest sistema, les cèl·lules HEK 293T produeixen virus amb capacitat infectiva però no replicativa, de manera que les cèl·lules diana incorporen el transgen però no produeixen virus. Les cèl·lules transfectades s'incubaren durant 48 h, moment en què es recollí el sobrenedant (portador de partícules víriques), es filtrà per eliminar-ne les cèl·lules mortes, i s'aliquotà en vials de criocongelació per emmagatzemar a -80°C fins al seu ús.

6.2.3. Determinació de la concentració de puromicina i polibrè

El vector d'expressió lentiviral incorpora un gen de resistència a puromicina, un antibiòtic inhibidor de la síntesi proteica, que permet seleccionar les cèl·lules infectades. La concentració de puromicina adequada varia segons el tipus cel·lular i cal ajustar-la per tal de seleccionar eficientment les cèl·lules infectades. Amb aquest objectiu, es tractaren HUVEC i cèl·lules HeLa amb diferents concentracions de puromicina, i es seleccionà, per a cada tipus cel·lular, aquella concentració que va provocar la mort cel·lular massiva (70-80%) en les primeres 24-48 h, i la mort de totes les cèl·lules als 3-4 dies. Per a les HUVEC fou de $0,7\ \mu\text{g/ml}$, i per a les HeLa, de $0,8\ \mu\text{g/ml}$.

També es determinà la concentració òptima de polibrè (bromur d'hexadimetrina), un polímer catiònic que neutralitza les càrregues que provoquen la repulsió entre virus i cèl·lula i, per tant, millora l'eficiència d'infecció. Per a les HUVEC, es va determinar una concentració d'ús de $8\ \mu\text{g/ml}$.

6.2.4. Titulació

Un cop produïdes les partícules víriques, se'n calculà la capacitat infectiva o títol viral mitjançant la infecció de cèl·lules HeLa amb un banc de dilució dels sobrenedants amb virus i posterior selecció per puromicina, tal i com s'indica al protocol de la casa comercial. D'aquesta manera, s'obtingué un valor de *cfu* (*colony forming units*) per a cada producció vírica, el qual s'utilitzà per calcular el volum de virus necessari per infectar cèl·lules amb una MOI (*multiplicity of infection*) determinada, essent la MOI el nombre de partícules víriques/cèl·lula.

MATERIAL I MÈTODES

6.2.5. Transducció de HUVEC

Les HUVEC es van sembrar en plaques de 100 mm de diàmetre (600.000 cèl·lules/placa) i es van infectar amb els diferents lentivirus amb una MOI=15 amb 8 µg/ml de polibè, tal i com indica la casa comercial. Passades 24 h, el medi amb virus es va substituir per medi complet, i les cèl·lules s'incubaren 24 h més abans d'afegir-hi puromicina (0,7 µg/ml). La selecció de cèl·lules infectades es va realitzar durant una setmana, i l'eficiència de la infecció es va poder avaluar visualment amb les cèl·lules transduïdes amb pLVX-GFP (Fig. 15).

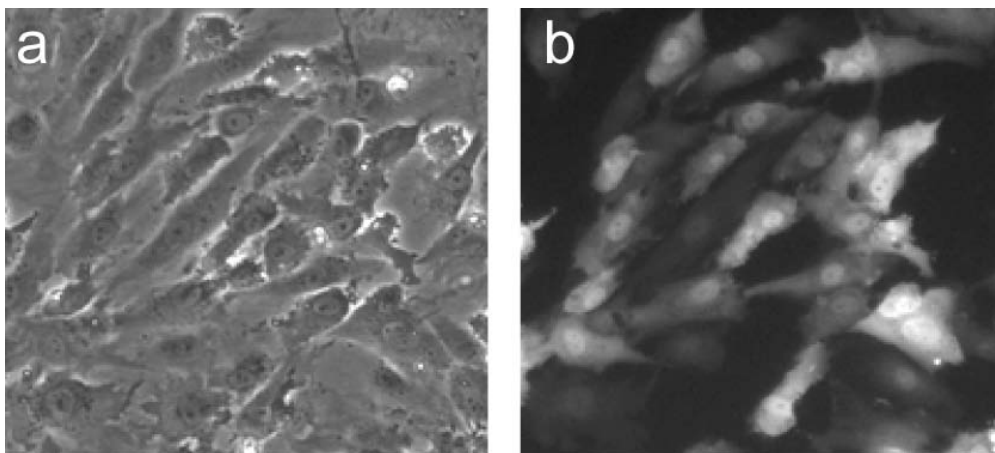


Figura 15. Imatge representativa de CMLV transduïdes amb el vector lentiviral per a la GFP. Les HUVEC es van infectar durant 48 h amb el lentivirus generat a partir del vector pLVX-GFP, i les cèl·lules transduïdes es seleccionaren amb puromicina (0,7 µg/ml, 5 dies). Es mostren imatges del mateix camp preses amb microscòpia òptica (a) o microscòpia de fluorescència (b).

7. SILENCIAMENT DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA MITJANÇANT siRNA

Un siRNA (*small interfering RNA*, o ARN d'interferència) és una molècula d'ARN de 20 a 25 nucleòtids dissenyada per a bloquejar específicament l'ARNm d'un gen en concret, interferint així en la seva expressió. Els siRNA, dirigits contra HIF-1α, HIF-2α o FBLN5, o bé els seus controls corresponents (amb seqüències a l'atzar, siRAND), es van introduir en les HUVEC mitjançant electroporació (o nucleofecció) utilitzant l'equip *Nucleofector*TM d'Amaxa i el *Amaxa*[®] *HUVEC Nucleofector*[®] Kit (Lonza), segons les indicacions de la casa comercial. Cada electroporació es dugué a

terme amb $1 \cdot 10^6$ cèl·lules i $1 \mu\text{g}$ de siRNA mitjançant el programa U₃-001 del *Nucleofector*TM. Just després de l'electroporació, les cèl·lules es van resuspendre en 1,5 ml de medi temperat i es van repartir en 3 pous de plaques de 6 (aproximadament 330.000 cèl·lules/pou) que contenen 1,5 ml de medi de cultiu. Passades 24 h, les cèl·lules es van incubar en condicions d'hipòxia o es van mantenir en normòxia. El bloqueig de l'expressió gènica es va comprovar per PCR en temps real o *Western blot*.

8. ANÀLISI D'EXPRESSIÓ

8.1. EXTRACCIÓ D'ARN

En la majoria dels casos, l'ARN de cèl·lules es va extreure amb el reactiu *Ultraspec*TM (Biotecx) seguint el seu protocol. Aquesta tècnica està basada en el mètode de Chomczynski [417], el qual, mitjançant l'ús de sals de guanidina, urea, fenols i cloroform, separa l'ARN en un medi aquós, deixant l'ADN i les proteïnes en una fase orgànica.

Les cèl·lules crescudes en monocapa es van lisar amb *Ultraspec*TM ($500 \mu\text{l}/10 \text{cm}^2$) i es recolliren amb l'ajuda d'un raspador. Les mostres de **teixit** (100 mg com a màxim) es van triturar en N₂ líquid en un morter de porcellana fins aconseguir un pols fi, al qual se li afegí 1 ml d'*Ultraspec*TM i s'homogeneïtzà amb l'ajuda d'un politró. Ambdós tipus de lisats es congelaren a -80°C i es descongelaren per facilitar-ne la lisi. El protocol es continuà segons les especificacions del fabricant.

Alguns procediments experimentals, com els estudis de *microarrays*, van requerir la utilització d'un ARN més pur que l'obtingut amb *Ultraspec*TM. Amb aquest propòsit, es va utilitzar l'*RNeasy Mini kit* (Qiagen). Aquest sistema es basa en columnes d'afinitat que retenen l'ARN en una membrana de sílice mitjançant tampons amb etanol i concentracions de sal elevades. Per a les **mostres de teixit humanes** que s'havien d'analitzar per *microarrays*, l'extracció d'ARN es va realitzar amb *Ultraspec*TM tal i com hem comentat anteriorment, i el producte final es va purificar utilitzant aquestes columnes. El sistema *RNeasy Mini kit* també es va utilitzar per als estudis de cèl·lules transfectades amb siRNA, ja que aquest sistema elimina molècules d'ARN de baix pes molecular com els siRNA, els quals interfereixen en l'amplificació per PCR en temps real.

MATERIAL I MÈTODES

Finalment, l'ARN obtingut, resuspès en aigua lliure de RNases, es va mantenir en gel per al seu ús immediat o es va guardar a -80°C.

8.2. DETERMINACIÓ DE LA QUANTITAT I QUALITAT DE L'ARN

L'ARN es va quantificar segons l'absorbància a 260 nm (1 U.A. = 40µg ARN), llegida en un espectrofotòmetre (*NanoDrop*, Thermo Scientific). La puresa de l'ARN ve determinada pel quocient 260/280, que per ser òptim ha de tenir un valor d'entre 1,8 i 2. Per tal d'avaluar la integritat de l'ARN es van realitzar electroforesis en gels d'agarosa a l'1,2% en tampó MOPS i en condicions desnaturalitzants i lliures d'*RNases*. Les mostres s'escalfaren a 65°C durant 10 min en tampó de càrrega amb bromur d'etidi (500 ng d'ARN + 3 µl de tampó de càrrega + H₂O q.s.p. 6 µl) i es van migrar durant 1 h a 60 V abans d'examinar-les amb llum UV. L'estat de l'ARN es va estimar segons la integritat de les bandes corresponents als ARNr 18S i 28S.

Per a les mostres que s'havien d'utilitzar en estudis per *microarrays*, la qualitat de l'ARN es va comprovar utilitzant la plataforma *2100 Bioanalyzer* i l'*RNA 6000 Nano kit* d'Agilent, els quals permeten una determinació més precisa de la qualitat de l'ARN mitjançant el càlcul del RIN (*RNA Integrity Number*). Aquest índex té en compte la integritat dels ARNr 18S i 28S i, a més a més, la quantitat de producte degradat. Per a la realització de *microarrays*, es considera que les mostres han de tenir un RIN mínim de 8, essent la màxima puntuació un 10.

8.3. RT-PCR EN TEMPS REAL

La **quantificació relativa dels nivells d'ARNm** dels gens d'interès es va realitzar per RT-PCR en temps real.

L'ARNm es va **retro-transcriure** a ADN de cadena senzilla complementària (ADNc) utilitzant el *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems). Aquest mètode utilitza seqüències aleatòries com a oligonucleòtids encebadors (*random primers*) i la transcriptasa reversa *MultiscribeTM*. Les reaccions es van realitzar a partir de 500 ng d'ARN en un volum total de 10 µl de reacció, seguint les instruccions de la casa comercial. L'ADNc s'emmagatzemà a -20°C fins a l'amplificació per PCR en temps real, que es va realitzar mitjançant el sistema

TaqMan® Gene Expression Assay i l'equip de detecció ABIPRISM 7000 o 7900HT (Applied Biosystems). Aquest mètode permet mesurar a temps real l'amplificació de productes mitjançant un sistema de dos oligonucleòtids encebadors i una sonda específica per a la seqüència diana. La sonda té un fluorocrom en el seu extrem 3' i una molècula inhibidora o *quencher* en 5' que, per proximitat, bloqueja l'emissió de fluorescència de la primera. La sonda hibrida a la part central de l'amplicó, però no emet fluorescència fins que la polimerasa topa amb ella i l'hidrolitza. D'aquesta manera es detecta l'amplificació d'un determinat producte amb una elevada especificitat. A l'Apèndix 1 s'inclou un llistat de les sondes *TaqMan* utilitzades. Les condicions de PCR van ser les següents:

Mescla de reacció per a la PCR en temps real (<i>Taqman</i>)		Cicles	
ADNc diluït 1/0	8,8 µl	50°C	2 min
<i>Master Mix</i>	11 µl	96°C	10 min
Sonda	0,88 µl	95°C	15 seg x 40
H ₂ O lliure de nucleases	1,32 µl	60°C	1 min
TOTAL	22 µl		

En el cas de la quantificació dels nivells d'ARNm de l'eritropoietina (EPO) de ratolí (veure l'apartat de *Resultats 1.9*), aquesta es va realitzar per PCR en temps real amb *SYBR-Green* i oligonucleòtids específics (*Apèndix 1*). El *SYBR-Green* és un agent intercalant que s'insereix a la doble hèlix d'ADN i s'acobla energèticament als àcids nucleics que el formen, de manera que s'incrementa notablement la seva taxa d'emissió fluorescent. El complex resultant presenta un pic d'absorció a 498 nm i un pic d'emissió a 522 nm. S'utilitzà el **Quantifast™ SYBR® Green PCR kit** (Qiagen) i l'equip de detecció ABIPRISM 7900HT (Applied Biosystems). Les condicions de la PCR s'indiquen a continuació:

Mescla de reacció per a la PCR en temps real (<i>SYBR-Green</i>)		Cicles:	
ADN	8,8 µl	95°C	10 min
<i>FastStart Universal</i>	11 µl	95°C	10 seg x 40
Oligonucleòtids encebadors, 20 µM cadascun	0,66 µl	60°C	30 seg
H ₂ O lliure de nucleases	1,54 µl	95°C	15 seg
TOTAL	22 µl	60°C	15 seg Corba de dissociació
		95°C	15 seg

MATERIAL I MÈTODES

Per cada 22 µl de reacció es realitzaren dues rèpliques de lectura de 10 cadascuna, que es sembraren en plaques de 384 pous. Els resultats es van normalitzar per l'expressió del gen endogen mitjançant una recta patró preparada amb dilucions seriades d'ADNc, o segons el mètode de $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

8.4. MICROARRAYS

Els dos estudis per *microarrays* que es presenten en aquest treball s'han dut a terme utilitzant plataformes diferents. El motiu no és altre que el sistema de què disposàvem inicialment d'Applied Biosystems va ser retirat del mercat, per la qual cosa el vam haver de substituir pel sistema *GeneChip® Microarrays* d'Affymetrix. El funcionament de cadascuna de les plataformes es resumeix a continuació:

8.4.1. Plataforma d'Applied Biosystems

Els *microarrays* d'Applied Biosystems utilitzaven un sistema de quimioluminescència d'alta sensibilitat. Es van fer servir els *Human Genome Survey Microarray V2.0*, els quals contenien 32.878 sondes que reconeixen més de 29.000 gens. La captació de quimioluminescència es va realitzar a l'equip *1700 Chemiluminiscent Microarray Analyzer*. Es va seguir el protocol d'amplificació, marcatge, hibridació i detecció d'ARN de la casa comercial, les bases del qual es resumeixen a continuació:

- 1. Conversió d'ARNm a ARNc marcat amb digoxigenina.** Es va partir d'1 µg d'ARN purificat per columna d'afinitat (Qiagen) amb un RIN superior a 8 i es va retro-transcriure a ADNc. Aquest es purificà per columnes d'afinitat i s'utilitzà íntegrament per a la reacció de transcripció de l'ADNc a ARNc. Els uracils trifosfat utilitzats en aquesta reacció portaven una molècula de digoxigenina incorporada (DIG-UTP), de manera que es va obtenir ARNc marcat amb digoxigenina, el qual es purificà per columnes d'afinitat i es quantificà per *NanoDrop*.
- 2. Hibridació de l'ARNc marcat i detecció.** L'ARNc marcat es va fragmentar i s'incubà als *microarrays* juntament amb controls d'hibridació proporcionats pel sistema. Un cop hibridats, els *microarrays* es van incubar amb un anticòs anti-digoxigenina acoblat a una fosfatasa alcalina, en presència de la qual, en afegir-hi el substrat adequat, emet quimioluminescència, que es va captar

mitjançant l'equip *1700 Chemiluminiscent Microarray Analyzer*. L'anàlisi es va realitzar amb el programa *Expression Array System Software* (Applied Biosystems).

Un cop feta la lectura del *microarray*, es comprovaren els diferents controls de qualitat per assegurar el bon funcionament de la tècnica mitjançant el programa *Expression Array System Software*. Primer, s'avaluà la qualitat total de la imatge (alineació dels punts, intensitat). A continuació, s'analitzen els diferents controls de qualitat incorporats a cada pas del procés. Com que no es va detectar cap errada en el processament dels *microarrays*, es va procedir a realitzar l'anàlisi d'expressió diferencial. Les dades resultants es van exportar per tal de realitzar una anàlisi més exhaustiva mitjançant el programa *Spotfire® Decision Site* (TIBCO). Aquesta eina va permetre analitzar detalladament els controls de qualitat interns i filtrar les mostres que no complien els requisits mínims (com per exemple aquelles amb errors de lectura o amb una intensitat massa feble). També es va comprovar el nivell de correlació entre *microarrays*. A continuació, les dades es normalitzaren pel mètode "*Quantile*", que és el més utilitzat per a la normalització de *microarrays* [418]. Les dades normalitzades es van analitzar mitjançant l'algoritme paramètric LIMMA (*Linear Models for Microarray Data*) [419]. La probabilitat d'obtenir falsos positius es va calcular aplicant el procediment de Benjamini & Hochberg per a l'obtenció de l'*FDR (false discovery rate)* [420, 421]. D'aquesta manera, es va generar una llista de gens diferencialment expressats entre dos grups de mostres amb un valor de "*Fold Change*" (vegades d'inducció o d'inhibició) i un valor de *FDR*. Les dades generades s'analitzaren aplicant una combinació de filtres més o menys restrictius sobre aquests dos paràmetres. Els gens que van passar els filtres s'analitzaren amb l'eina "*Gene Expression Data Analysis*" (Panther, *Protein Analysis Through Evolutionary Relationships*, www.pantherdb.org) per tal de trobar-hi un significat biològic. Finalment, els resultats obtinguts es van verificar per PCR en temps real.

8.4.2. Plataforma d'Affymetrix

El sistema d'Affymetrix es basa en l'amplificació de molècules d'ADN sentit biotinilades, les qual hibriden amb xips que contenen un set de sondes diferents per a cada transcrit. S'utilitzaren els *GeneChip® Gene 1.0 ST Array*, els quals reconeixen 28.869 gens mitjançant unes 26 sondes distribuïdes al llarg de cada transcrit. A continuació es resumeix el protocol d'obtenció de l'ADN fragmentat i

MATERIAL I MÈTODES

marcat, a partir de l'ARN, mitjançant el *GeneChip*® *WholeTranscript (WT) Sense Target Labeling Assay*:

- 1. Síntesi d'ADNc de doble cadena.** Es va partir de 300 ng d'ARN amb valors de RIN d'entre 9,5 i 10. Primer es va retrotranscriure l'ARN a ADNc, i després es realitzà la síntesi de la cadena complementària d'aquest mitjançant hexàmers de seqüència aleatòria que incorporen la seqüència del promotor T7, obtenint ADN de doble cadena.
- 2. Transcripció: síntesi d'ARNc.** La doble cadena d'ADNc s'utilitzà com a motllo per a la T7 ARN polimerasa, produint múltiples còpies d'ARNc antisentit. Aquest es va purificar mitjançant columnes d'afinitat i es quantificà per *NanoDrop*.
- 3. Síntesi d'ADNc sentit.** A partir de 10 µg d'ARNc, es va retro-transcriure l'ADNc sentit mitjançant hexàmers *random* i incorporant dUTP. Després d'hidrolitzar l'ARNc amb RNasa H, l'ADNc es va purificar per columnes d'afinitat i es va quantificar per *NanoDrop*.
- 4. Fragmentació de l'ADNc marcatge i hibridació.** L'ADNc es va incubar amb una combinació d'uracil ADN glicosilasa i d'endonucleasa 1 apurínica/apirimidí-mica, que reconeix específicament els residus dUTP, trencant les cadenes d'ADN. A continuació, l'ADNc fragmentat es va marcar amb biotina mitjançant la deoxinucleotidil transferasa terminal i es va hibridar en els *microarrays*, els quals, després de tenyir-se amb estreptavidina, es van escanejar mitjançant el *GeneChip*® *Scanner 3000 7G*.

Els resultats es van analitzar amb el programa *Partek Genomics Suite* (Partek Inc). La sumarització i normalització de les dades es va realitzar utilitzant com a mètode estadístic l'ANOVA modificat (Partek Inc). Els p-valors obtinguts de les comparacions es van ajustar mitjançant el mètode de Benjamini & Hochberg per tal de corregir l'efecte dels múltiples contrastes, obtenint el valor de *FDR*. Els gens diferencialment expressats entre condicions es van obtenir per filtració segons l'*FDR* i el *Fold Change*. A continuació, els resultats es van analitzar a nivell funcional mitjançant el mateix programa i la base de dades *Gene Ontology* (GO).

9. ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ PROTEICA

9.1. OBTENCIÓ D'EXTRACTES PROTEICS

9.1.1. Extractes cel·lulars

Les cèl·lules cultivades en monocapa es van rentar 2 cops amb PBS i es van lisar amb tampó de lisi bullint (80-100 µl/pou 10 cm²) amb l'ajuda d'un raspador [422]. El lisat es va congelar a -80°C, es descongelà per optimitzar-ne la lisi, i es disgregà mecànicament amb l'ajuda d'una xeringa d'insulina. La concentració proteica s'avaluà segons el mètode de l'àcid bicinonínic (BCA) [423] amb el *BCA Protein Assay*TM (Pierce). Els extractes proteics es van conservar a -20°C fins a la seva utilització.

9.1.2. Extractes de sobrenedants de cèl·lules en cultiu

Les cèl·lules es van cultivar en medi lliure de sèrum en les condicions indicades. Passat els temps corresponents, es va recollir el sobrenedant (5 ml), i es va concentrar en PBS mitjançant columnes d'exclusió (*Amicon Ultra*, Millipore), les quals van descartar les proteïnes amb un pes molecular inferior a 10 kDa. Aquestes columnes permeten concentrar la mostra i realitzar un canvi de tampó en passar-hi un volum total de PBS equivalent a 5 vegades el volum inicial de sobrenedant cel·lular mitjançant centrifugacions successives. Els sobrenedants es van concentrar fins a un volum d'uns 250 µl. L'extracte proteic es va quantificar segons el mètode del BCA.

9.1.3. Extractes de teixit

Els teixits congelats es trituraren en N₂ líquid amb un morter de porcellana fins aconseguir-ne un pols fi, que es va recollir en un tub de centrífuga de 2 ml i s'hi va afegir 1 ml de tampó de lisi (amb inhibidors de proteases) per cada 100 mg de teixit. La mescla s'homogeneïtzà en gel amb l'ajuda d'un politró, es congelà a -80°C, es descongelà i es centrifugà a màxima potència durant 5 min a 4°C. El sobrenedant es va recuperar, i la concentració de proteïnes solubles es quantificà per BCA.

MATERIAL I MÈTODES

9.1.4. Extractes nuclears

L'obtenció d'extractes nuclears de cèl·lules HeLa es va dur a terme mitjançant el *NucBuster Protein Extraction kit* (Novagen). Les cèl·lules es van sembrar en plaques de Petri de 100 mm de diàmetre ($1,2 \cdot 10^6$ cèl·lules/placa) i es sotmeteren als tractaments corresponents. Les plaques es van col·locar sobre gel i les cèl·lules es van rentar dos cops amb PBS fred. A continuació, es van recollir en 1,5 ml de PBS fred (2 cops) amb l'ajuda d'un raspador, i es va començar el protocol d'extracció de nuclis segons les instruccions del *NucBusterTM Protein Extraction kit* (Novagen). Aquest mètode es basa en dues lisis successives mitjançant dos tampons d'extracció: amb el primer s'eliminen els components citoplasmàtics i amb el segon s'obtenen els extractes nuclears. Abans d'afegir el segon tampó, es va observar al microscopi una al·lquota de cada mostra per comprovar que la lisi cel·lular fos completa i els nuclis íntegres. Tot el procés es va realitzar en presència d'inhibidors de proteases. Els extractes nuclears es van al·lquotar per evitar cicles repetitius de congelació-descongelació que podrien promoure la degradació proteica, es van congelar en N₂ líquid i es van guardar a -80°C fins a la seva utilització. Els extractes es quantificaren segons el mètode del BCA.

9.2. WESTERN-BLOT

Els extractes proteics es van bullir durant 5 min en tampó Laemli i es van separar per electroforesi en gel de poliàcrilamida amb dodecil sulfat sòdic (SDS-PAGE) (gels al 10% d'acrilamida:bisacrilamida 37,5:1) en condicions reductores. Les proteïnes es van transferir a membranes de fluorur de polivinidè (*Immobilon-P*, porus de 0,45 µm; Millipore) en tampó de transferència amb metanol, a 200 mA durant 90 min a 4°C. Les membranes es van tenyir amb roig Ponceau per tal de comprovar-ne la correcta migració i transferència; tot seguit, l'excés de colorant es va rentar amb aigua destil·lada. A continuació, les membranes es van saturar durant 1 h amb una solució al 5% de llet sense greixos en TBS-Tween 0,05%, i s'incubaren amb els anticossos primaris pertinents durant 1 h a temperatura ambient i en agitació suau. Després de la incubació amb l'anticòs primari, es van fer 2 rentats amb TBS-Tween 0,05% (2 cops, 5 min), seguits de 2 rentats més amb TBS (2 cops, 5 min) a temperatura ambient i en agitació. La unió de l'anticòs primari a la proteïna d'interès es detectà mitjançant l'addició d'un anticòs secundari que reconeix les IgG de l'espècie animal on es generà l'anticòs primari. Aquest anticòs secundari està unit a peroxidasa de rave (HRP, *horseradish peroxidase*), de manera que en

afegir el substrat adequat (*SuperSignalTM West Dura*, Pierce), emet quimioluminiscència, la qual es va detectar mitjançant pel·lícules autoradiogràfiques CURIX RP2 PLUS (Agfa), revelades per procediments fotogràfics estàndards. Es va verificar que la càrrega de proteïna fos homogènia mitjançant la determinació dels nivells de β -actina (Clon AC15, Sigma) o nucleolina (ab22758, Abcam), en el cas dels extractes nuclears.

9.3. IMMUNOCITOQUÍMICA

Les HUVEC o les BAEC es van sembrar a una densitat de $2 \cdot 10^4$ cèl·lules/pou, en un volum de 90 μ l, en plaques amb fons de vidre de 12 mm de diàmetre i 0,17 mm de gruix (*Willco Wells B.V.*) prèviament gelatinitzades. Pel que fa als experiments de silenciament de FBLN5, les HUVEC es van nucleofectar tal i com s'ha explicat anteriorment, i es van sembrar a una densitat de $6 \cdot 10^4$ cèl·lules/placa. Un cop adherides (passades 1-3 h), s'hi varen afegir 1,5 ml de medi. Per tal de caracteritzar l'expressió de la LOX i de la FBLN5, les cèl·lules es van deixar 18 h en medi complet i després es van incubar durant 24 h o 48 h més en medi de quiescència en condicions de normòxia o hipòxia. A continuació, les cèl·lules es rentaren ràpidament amb PBS (2 cops), i es fixaren amb paraformaldehid al 4% durant 15 min a temperatura ambient. Seguidament es van rentar amb PBS (5 min, 2 cops) i es van permeabilitzar per tal d'analitzar la localització intracel·lular de la proteïna amb una solució de PBS-Tween 0,5% al 0,1% de BSA, que es va deixar actuar durant 30 min a temperatura ambient. La permeabilització es va ometre quan es va voler caracteritzar la localització extracel·lular de la FBLN5. A continuació, les preparacions s'incubaren amb solució de bloqueig (PBS al 0,1% de BSA) (15-30 min, 2 cops). Tot seguit, es van incubar amb *Image-ITTM FX Signal Enhancer* (Invitrogen) durant 30 min. Després de dos rentats amb PBS, s'hi van afegir els anticossos primaris (veure

Taula 6) en solució de bloqueig, i es van incubar durant 1 h a temperatura ambient. Les preparacions es van rentar amb PBS (5 min, 2 cops) i se'ls afegí una mescla amb l'anticòs secundari (veure Taula 5), colorant de Hoechst (1:1000; 33342, Molecular Probes) i, en les cèl·lules permeabilitzades, fal·loïdina (1:40; *Alexa Fluor 633*, Molecular Probes), tot plegat protegit de la llum. Després d'1 h d'incubació, les plaques es van rentar amb PBS (2 cops) i es van muntar amb medi *ProLong[®] gold antifade reagent* (Molecular Probes).

MATERIAL I MÈTODES

Taula 5. Anticossos utilitzats en immunocitoquímica.

Antigen	Anticòs primari	Dilució	Anticòs secundari	Dilució
LOX	ab31238	1:1000	Anti-IgG de conill fet en cabra <i>Alexa Fluor 488</i>	1:1000
FBLN5	ab36611	1:2000	Anti-IgG de ratolí fet en ase <i>Alexa Fluor 488</i>	1:1000

10. ANÀLISI DE L'ACTIVITAT LISIL OXIDASA

El mètode de valoració de l'activitat lisil oxidasa es basa en la mesura de la producció de H₂O₂ en presència o absència de BAPN (-aminopropionitril), un inhibidor específic de la LOX.

Les BAEC es van mantenir en medi M199 (Gibco) sense roig fenol, antibiòtics, glutamina ni FBS en condicions de normòxia o hipòxia durant els temps indicats. Els sobrenedants es van recollir i es van centrifugar per eliminar-ne les cèl·lules mortes. Es va preparar una mescla amb 200 µl de sobrenedant i 50 µl de tampó de reacció (borat 50 mM, urea 1,2 M; pH 8,2). En paral·lel, es van preparar les mateixes reaccions en presència de BAPN (500 µM). A continuació s'hi van afegir 5 µl d'una mescla de cadaverina (1,2-diaminopentà; Sigma), HRP i *Amplex red* (*Amplex Red Monoamine Oxidase Assay kit*; Molecular Probes), a de 10 mM, 1 U/ml i 10 µM, respectivament (concentracions finals). Aquesta mescla es va afegir en tots els tubs a la vegada (es va desar a la paret dels tubs i es van vortejar tots alhora). Tot seguit, les mostres es van incubar durant 30 min a 37°C en agitació i protegides de la llum, i la reacció es va parar en gel. Es va transferir una alíquota de 25 µl de cada mostra a una placa de 96 pous blanca amb el fons pla i, mitjançant un espectrofluorímetre (*SpectraMax Gemini EM*, Molecular Devices), es va determinar l'emissió de fluorescència a una longitud d'ona d'excitació de 563 nm i d'emissió de 587 nm. L'activitat lisil oxidasa és la diferència entre la intensitat de la fluorescència de les mostres incubades sense i amb BAPN i s'expressa en tant per cent respecte a la condició control (normòxia).

11. ASSAIG DE POLIMERITZACIÓ DE COL·LAGEN

S'obtingueren CML d'aorta de ratolins Tg-LOX^{SMC+} de les 3 famílies (W, X i Z) i de ratolins control, de 2 mesos d'edat, tal i com es detalla a l'apartat 3.2.1. Les CMLVm, en passatge 2, es van sembrar a raó de 50.000 cèl·lules/pou en placa de 6. Passats 7 dies, se'ls canvià el medi, que es va recollir passats 3 dies. Els sobrenedants es van centrifugar per tal d'extreure'n les cèl·lules mortes i es van concentrar 4 vegades mitjançant columnes d'exclusió (*Amicon Ultra*, 10 kDa; Millipore). Es varen pre-incubar 150 µl de col·lagen de tipus 1 (BD Biosciences) durant 40 min a 37°C en plaques amb fons de vidre (*Willco Wells B.V.*). Tot seguit s'hi van afegir 400 µl del medi de cultiu concentrat i tot plegat es va mantenir en l'incubador a 37°C durant 24 h més. Passat aquest temps, les preparacions es van observar per microscòpia de reflexió en un microscopi confocal, i les fibres de col·lagen es van captar realitzant seccions en Z.

12. ANÀLISI DE L'APOPTOSI PER UNIÓ A ANNEXINA V

Quan les cèl·lules devenen apoptòtiques, la membrana plasmàtica perd la seva integritat, de manera que la fosfatidilserina queda exposada a l'exterior. L'annexina V és una proteïna que presenta una elevada afinitat per a la fosfatidilserina, i que en conjuguar-se a fluorocroms, com ara el FITC, serveix com a indicador d'apoptosi. En aquest estudi es va utilitzar el *FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I* (BD Pharmingen).

Per tal d'analitzar la implicació de la FBLN5 en la supervivència a la hipòxia, la seva expressió es va bloquejar en cèl·lules HUVEC nucleofectades amb un siRNA específic (veure apartat 7). L'endemà, el medi complet es va canviar per medi de quiescència, i les cèl·lules es van mantenir en condicions de normòxia o hipòxia durant 16 h. Passat aquest temps, les cèl·lules es van tripsinitzar i es van incubar amb annexina V conjugada a FITC i iodur de propidi (PI) segons les instruccions de la casa comercial. El PI s'uneix a l'ADN, indicant mort cel·lular (tant apoptosi com necrosi). La unió de les cèl·lules a annexina V i la tinció amb PI es va analitzar per FACS (*Fluorescence-activated cell sorting*) en un citòmetre de flux EPICS® XLTM. Es va quantificar el nombre de cèl·lules en estadis primerencs d'apoptosi, és a dir, les positives per a annexina V i negatives per a PI.

MATERIAL I MÈTODES

13. ANÀLISI D'UNIÓ PROTEÏNA-ADN

13.1. ASSAIG DE RETARD DE LA MOBILITAT ELECTROFORÈTICA (EMSA)

Aquesta tècnica permet analitzar la capacitat d'unió de proteïnes nuclears a una seqüència d'ADN. La tècnica es basa en la separació electroforètica dels complexos de proteïna i ADN, els quals presenten una menor mobilitat que la de la sonda d'ADN lliure.

Es van sembrar cèl·lules HeLa en plaques de Petri de 100 mm de diàmetre ($1,2 \cdot 10^6$ cèl·lules/placa) i, passats 2 dies, es van sotmetre a hipòxia durant 24 h. Alternativament, es va a sobre-expressar HIF-1 α per transfecció. Es van sembrar $1,65 \cdot 10^6$ cèl·lules/placa, que es van transfectar segons s'indica a 6.1 amb un vector d'expressió específic, i es mantenen en cultiu durant 48 h. Els extractes nuclears de les dues aproximacions es van obtenir tal i com s'indica a l'apartat 9.1.4.

Les sondes d'ADN de doble cadena es van generar a partir de dos oligonucleòtids complementaris. Se'n van preparar dues: una amb l'HRE nadiu present en el promotor de la FBLN5 (posicions -78 a -74, FBLN5 HRE) i l'altra amb tres bases del mateix HRE mutagenitzades (FBLN5 mut-HRE). Les seqüències 5'→3' es mostren a continuació:

Sondes utilitzades per a l'EMSA

FBLN5 HRE 5'-GAGGAGGCCGACGTGCCCCGAGCTCC-3'

FBLN5 mut-HRE 5'-GAGGAGGCCGTTTTGCCCCGAGCTCC-3'

S'han subratllat els elements HRE nadiu i mutagenitzat.

Les dues cadenes complementàries de cada sonda es van hibridar bullint 10 μ g de cada oligonucleòtid en tampó TE amb NaCl 150 mM durant 5 min, i deixant-les refredar progressivament. La formació correcta de la doble cadena es va comprovar en gel de poliacrilamida al 20%. Les bandes corresponents a les sondes hibridades es van retallar i es van eluir en tampó d'elució (acetat d'amoni 0,5 M, SDS 0,1%, EDTA 1 mM) durant 16 h a 37°C en agitació. Les sondes es van marcar radioactivament amb [γ -³²P]-ATP mitjançant T4 polinucleòtid cinasa (Roche) i es van purificar per columna de *Sephadex G-50* (GE Healthcare). La radioactivitat incorporada es va estimar per contacte amb líquid de centelleig (Biogreen) en un comptador (*Beckman Coulter LS 6500*).

Els assajos d'EMSA es van realitzar mitjançant l'*EMSA Accessory Kit* (Novagen). Les proteïnes nuclears es van incubar durant 15 min en gel amb 0,01 U de poly-d [I-C] i 500 ng d'ADN d'esperma de salmó sonicat en HEPES 20 mM (pH 8), EDTA 0,2 mM, KCl 100 mM, 20% de glicerol i 0,5 mM de DTT. Per confirmar la identitat del factor de transcripció responsable del patró de retard, s'hi van afegir 4 µg d'anticòs anti - HIF-1α (ab16066; Abcam), i es van incubar en gel durant 15 min més. A aquesta mescla s'hi van afegir aproximadament 40.000 cpm de la sonda marcada radioactivament i es va incubar en gel durant 30 min en un volum total de 20 µl. Els complexos ADN-proteïna es van separar per electroforesi a 4°C en un gel de poliacrilamida al 5% en TBE 0,5 X, prèviament pre-corrregut durant 1 h a 100 V i a 4°C per tal d'estabilitzar el voltatge. L'electroforesi es va desenvolupar a 190 V durant aproximadament 2 h a 4°C. A continuació, el gel es va transferir a paper *Whatman* de 3 mm, es va assecat i es va exposar a una pantalla sensible als rajos β (*Storage Phosphor Screen*, GE Healthcare Life Sciences), la qual es va escanejar mitjançant el *Molecular Dynamics Typhoon PhosphorImager* (GE Healthcare Life Sciences). Les imatges resultants s'analitzaren mitjançant el programa *ImageQuant™*.

13.2. IMMUNOPRECIPITACIÓ DE CROMATINA (ChIP)

Aquest mètode permet analitzar la unió de determinats factors de transcripció a un element de resposta en condicions *in vivo*. Per tal d'avaluar la unió de HIF-1α a l'HRE del promotor de la FBLN5, es va fer servir l'*ExactaChIP™ Human/Mouse HIF-1α Chromatin Immunoprecipitation Kit* (R&D Systems).

Es van sembrar HUVEC en plaques de 100 mm de diàmetre (500.000 cèl·lules/placa) i, passats 3 dies, se'ls va canviar el medi complet per medi de quiescència i es van mantenir en condicions de normòxia o d'hipòxia durant 4 h. Passat aquest temps, les cèl·lules es van fixar en formaldehid a l'1% durant 15 min. La fixació es va aturar afegint-hi glicina a una concentració final de 125 mM. Les HUVEC es van rentar i recollir en PBS fred amb l'ajuda d'un raspador. A continuació es van lisar en presència d'inhibidors de proteases, en fred i seguint les instruccions de la casa comercial. La cromatina es va fragmentar per sonicació. Les condicions de sonicació es van posar a punt per aconseguir fragments d'ADN d'entre 0,5 i 1 kb. Els lisats es van centrifugar i es va descartar el precipitat. Una part del sobrenedant (20 µl) es va guardar com a control o *input*, i la resta es va immunoprecipitar amb l'anticòs anti-HIF-1α proveït pel *kit* (5 µg) o amb una IgG inespecífica com a control negatiu.

MATERIAL I MÈTODES

Els immunoprecipitats es van recuperar mitjançant boles d'agarosa recobertes d'estreptavidina (Sigma) les quals, després de rentar-les exhaustivament, es van bullir durant 10 min en presència d'una solució de resina quelant. Aquest pas reverteix la unió entre l'ADN i la proteïna. Els complexos proteics queden units a les boles, que se separen fàcilment de l'ADN per centrifugació. Finalment, l'ADN es va purificar per columnes d'afinitat (*PCR Extraction Kit*, Qiagen), i es va eluir en 50 µl d'aigua desionitzada. La quantificació de l'ADN immunoprecipitat es va realitzar per PCR en temps real a partir de 8,8 µl de l'eluït, en un volum final de reacció de 22 µl i segons el mètode de *SYBR-Green* (veure apartat 8.3) Es van dissenyar oligonucleòtids encebadors específics per amplificar la regió del promotor de *FBLN5* que conté l'HRE, concretament de la posició -245 a la +59, respecte a l'ATG:

Oligonucleòtids encebadors per amplificar el gen *FBLN5* de -245 a +59 en els estudis de ChIP

Sentit	5'-GCTAAGCAAACCAGGTGCT-3'
Antisentit	5'-GTGCGAAGGCGAGAAGAAA-3'

Paral·lelament, i amb els mateixos oligonucleòtids encebadors, es va amplificar la fracció reservada com a *input*, prèviament tractada per revertir la unió ADN-proteïna. Es va diluir l'*input* 1:10 en tampó de dilució (volum final: 200µl), s'hi van afegir 8 µl de NaCl 5 M, i s'incubà durant 5 h a 65°C. Passat aquest temps, s'hi van afegir 4 µl d'EDTA 0,5 M, 8 µl de Tris 1 M a pH 6,5 i 0,8 µl d'una solució de Proteasa K a 10 mg/ml, i s'incubà durant 1 h a 45°C per degradar la proteïna. Finalment, l'ADN es va purificar i eluir tal i com s'havia fet amb l'immunoprecipitat. Com a control positiu, es va amplificar per PCR convencional un fragment del promotor del VEGF que conté un HRE mitjançant els oligonucleòtids encebadors proveïts pel *kit*.

L'abundància relativa de les seqüències específiques en l'ADN immunoprecipitat es va determinar utilitzant el càlcul del $\Delta\Delta Ct$. Les quantificacions es van corregir tenint en compte que el material immunoprecipitat corresponia a un 4% de l'*input* [424].

14. HISTOLOGIA

14.1. PROCESSAT DE LES MOSTRES

Les mostres de teixit es van fixar en paraformaldehid al 4% el més ràpidament possible després de la seva extracció, i es van incubar durant 24 h a temperatura ambient. La fixació es completà amb 2 banys successius en fixador *Gliofixx* (30 min cadascun). Tot seguit, els teixits es deshidrataren mitjançant 5 banys en etanol absolut (45 min x 5), seguits de 3 banys en xilol (45 min x 3). Finalment, les mostres es van parafinar en 2 banys de parafina líquida (60°C) d'una hora cadascun. A continuació, les mostres es van incloure en blocs de parafina i se'n van fer seccions de 5 µm de gruix amb un micròtom, les quals es van disposar en portaobjectes prèviament xilanitzats (veure apartat 14.2). L'aigua romanent s'eliminà deixant assecar les preparacions a 40°C, que es van guardar a temperatura ambient fins al seu ús.

14.2. PREPARACIÓ DELS PORTAOBJECTES

Per tal de millorar l'adherència dels talls histològics als portaobjectes, aquests es van tractar amb xilà. Els portaobjectes es van rentar un a un amb etanol absolut i es van disposar en cistelles, les quals es van submergir en solució de xilanització (3-aminopropil-trietoxisilà al 2% en acetona) durant 1 h. A continuació, els portaobjectes es van rentar 2 cops amb aigua destil·lada, durant no més de 10 min per rentat. Finalment, els portaobjectes es van assecar a 60°C, i es van mantenir a temperatura ambient fins al seu ús.

14.3. TINCIONS I IMMUNOHISTOQUÍMICA

Les preparacions es van desparafinar amb 2 banys successius en xilol de 7 minuts cadascun. A continuació es van rehidratar mitjançant etanol absolut, de 95° i de 70° i aigua destil·lada, realitzant dos banys successius de 3 min en cadascuna de les solucions. Les restes d'etanol s'eliminaren amb aigua de l'aixeta, abans de realitzar l'últim bany de 5 min en aigua destil·lada.

MATERIAL I MÈTODES

14.3.1. Tinció Tricròmica de Masson

Aquesta tinció permet visualitzar els nuclis en blau fosc, el citoplasma i els eritròcits en vermell, i el col·lagen en blau.

Les preparacions es van fixar en Solució de Bouin durant 30 min, es van rentar amb aigua de l'aixeta i es van incubar en Blau Celest durant 12 min. Després de rentar-se amb aigua destil·lada, es van tenyir amb Hematoxilina de Mayer durant 12 min. Les preparacions es van rentar amb aigua de l'aixeta, es van diferenciar amb alcohol àcid a l'1% durant 30 seg i es van tornar a rentar amb aigua de l'aixeta, abans de tractar-se amb àcid fosfomolíbdic a l'1% durant 4 min. Les preparacions es van deixar drenar, es van tenyir amb Blau de Metilè durant 4 min, es van rentar amb aigua destil·lada i es van tractar amb àcid acètic a l'1% durant 2 min. Les preparacions es van rentar en etanol al 70% i es van deshidratar en etanol al 95% i etanol absolut durant 2 min cadascun, seguit de dos banys de 3 min en *Histoclear*. Finalment es van muntar amb *Histomount*.

14.3.2. Hematoxilina-Eosina

Aquesta tinció permet observar els nuclis en blau i el citoplasma en rosa. Les mostres es van tenyir amb Hematoxilina de Mayer durant 5 min, i es van rentar amb aigua de l'aixeta durant 5 min més. A continuació, es van tenyir amb eosina durant 20", i es rentaren amb aigua de l'aixeta durant 5 min. Les restes de colorant s'acabaren d'eliminar amb un rentat breu en etanol al 95%. Finalment les preparacions es van deshidratar i muntar seguint el mateix procediment explicat en la Tinció Tricròmica de Masson.

14.3.3. Immunolocalització de LOX

Les preparacions es van sotmetre al procés d'*antigen retrieval* o desemmascament de l'antigen en un vas *Coplin* amb una solució de Tris 10 mM en HCl, pH 10, tot plegat en un bany de vapor a 95-99°C, durant 20 min. A continuació el vas *Coplin* es va treure del bany i es va deixar refredar a temperatura ambient durant 30 min. Les preparacions es van col·locar en una cambra o suport humit, on es feren totes les incubacions posteriors. Les mostres es van rentar amb PBS (5 min, 2 cops), es van col·locar en un vas *Coplin* i s'hi van incubar amb una solució de bloqueig de la peroxidasa (45 ml metanol + 5 ml H₂O₂) durant 30 min.

De nou en cambra humida, es van rentar amb PBS (5 min, 2 cops) i es van permeabilitzar amb PBS-Tween 1% durant 5 min. Per tal d'evitar unions inespecífiques, les mostres es van bloquejar amb una solució de PBS-Tween 0,1% amb un 10% de sèrum de cabra durant 30 min. A continuació, les mostres es bloquejaren per a l'avidina i la biotina amb l'*Avidin/Biotin Blocking Kit* (Vector Laboratories). Primerament es van incubar amb solució d'avidina durant 15 min i es van rentar amb PBS-Tween 0,1% amb un 1% de sèrum de cabra (5 min, 3 cops), després s'incubaren amb solució de biotina (15 min) i es rentaren de la mateixa manera. A continuació, les mostres s'incubaren amb un anticòs primari dirigit contra la LOX generat en conill al nostre laboratori a una dilució 1:50, durant 2 h en agitació suau. Les preparacions es van rentar amb PBS-Tween 0,1% (5 min, 3 cops), i s'incubaren amb un anticòs secundari dirigit contra les IgG de conill, fet en cabra i conjugat a biotina, i diluït 1:200 en PBS-Tween 0,1% a l'1% de sèrum de cabra durant 30 min en agitació suau. Després de 3 rentats de 5 min amb PBS, les mostres es van incubar amb el reactiu *ABC* (Vector Laboratories), i es van tornar a rentar amb PBS (5 min, 3 cops). A continuació, les preparacions es van revelar utilitzant diaminobenzidina com a substrat de la peroxidasa (*DAB Substrate*; Roche), i la reacció es va aturar amb aigua de l'aixeta. Després de fer un rentat en aigua destil·lada, les mostres es van deshidratar i muntar tal i com s'ha indicat anteriorment.

14.3.4. Immunolocalització de FBLN5

Després de rehidratar les mostres, es va bloquejar l'activitat peroxidasa i es realitzà la permeabilització tal i com s'ha indicat anteriorment. Els bloquejos d'unions inespecífiques i de l'avidina i la biotina es realitzaren de la mateixa manera que per la LOX però amb sèrum de cavall. L'anticòs primari (ab66339, Abcam) es va incubar a una dilució 1:500, en PBS-Tween 0,1% amb un 1% de sèrum de cavall, a 4°C durant tota la nit i en agitació suau. Després dels 3 rentats amb TBS-Tween 0,1%, les preparacions es van incubar amb l'anticòs secundari dirigit contra les IgG de ratolí (fet en cavall i conjugat a biotina), i diluït 1:200 en PBS-Tween 0,1% a l'1% de sèrum de cavall durant 1 h en agitació suau. La resta del protocol es va realitzar de la mateixa manera que per a la LOX.

MATERIAL I MÈTODES

14.3.5. Captació d'imatges

Les imatges dels talls histològics es van captar per microscòpia òptica mitjançant un microscopi Olympus Vanox AHB3 acoblat a una càmera digital Sony DXC-S500, i es van processar amb el programa *Photo Smart* (Hewlett-Packard).

15. ANÀLISI ESTADÍSTICA

Els resultats s'expressen com a la mitjana \pm l'error estàndard de la mitjana (SEM), o bé la desviació estàndard de la mitjana (SD). Exceptuant les dades obtingudes amb els *microarrays*, l'avaluació estadística dels resultats es va realitzar segons l'anàlisi de la variància (ANOVA) o per la prova *t de Student*, en funció del nombre de grups comparats. En els estudis realitzats amb animals o amb mostres humanes es va aplicar el test no paramètric *Mann-Whitney*. En cas de trobar diferències significatives entre grups, es va aplicar el test de comparació múltiple de *Tukey-Kramer*. L'anàlisi es va realitzar amb el programa estadístic *GraphPad Instat*. Les diferències es consideraren significatives per a $p < 0,05$.

RESULTATS

1. ESTUDI DE LA REGULACIÓ DE LA LOX PER HIPÒXIA EN CE I DELS MECANISMES IMPLICATS

1.1. Expressió de LOX a la paret arterial

Tal i com ja hem comentat a la introducció, la LOX s'expressa en diversos teixits, principalment aquells amb un elevat contingut elàstic com el teixit vascular, si bé fins la realització dels nostres estudis no s'havia caracteritzat el patró d'expressió d'aquest enzim a la paret vascular. Tal i com s'observa a la Fig. 17, els estudis immunohistoquímics en artèries coronàries humanes i en aorta abdominal porcina van revelar un patró d'expressió similar, amb una forta expressió d'aquest enzim a l'endoteli vascular i a l'adventícia, i una feble tinció a la media.

El patró d'expressió de la LOX i d'altres isoenzims de la família es va caracteritzar per PCR en temps real en la capa adventícia i la íntima/media d'artèries coronàries humanes. Així, vam constatar que la LOX i la LOXL2 són els isoenzims més expressats a la paret vascular tant a la capa íntima/media com a l'adventícia, però en major grau en aquesta darrera (Fig. 16). L'expressió de LOXL1 és minoritària, mentre que els nivells d'ARNm de LOXL3 i LOXL4 són pràcticament imperceptibles (no es mostra).

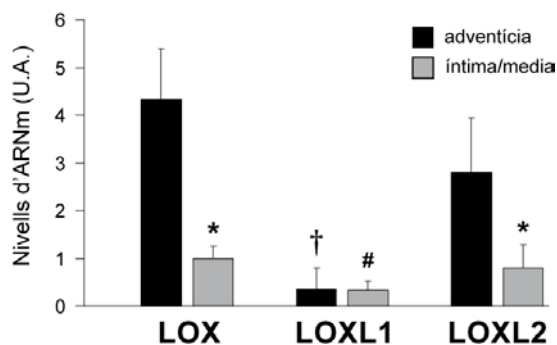


Figura 16. Expressió de les isoformes LOX, LOXL1 i LOXL2 en artèries coronàries humanes. Es mostren els nivells relatius d'ARNm de LOX, LOXL1 i LOXL2 a la capa adventícia i íntima/media d'artèries coronàries humanes provinents de 5 individus, avaluats per PCR en temps real. Les dades es van normalitzar segons els nivells d'expressió de l'ARNr 18S. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm SEM (n=5; p<0,05: *, vs. l'expressió del mateix isoenzim a l'adventícia; †, vs. l'expressió de LOX i LOXL2 a l'adventícia; #, vs. l'expressió de LOX a la íntima/media). U.A.: unitats arbitràries.

RESULTATS

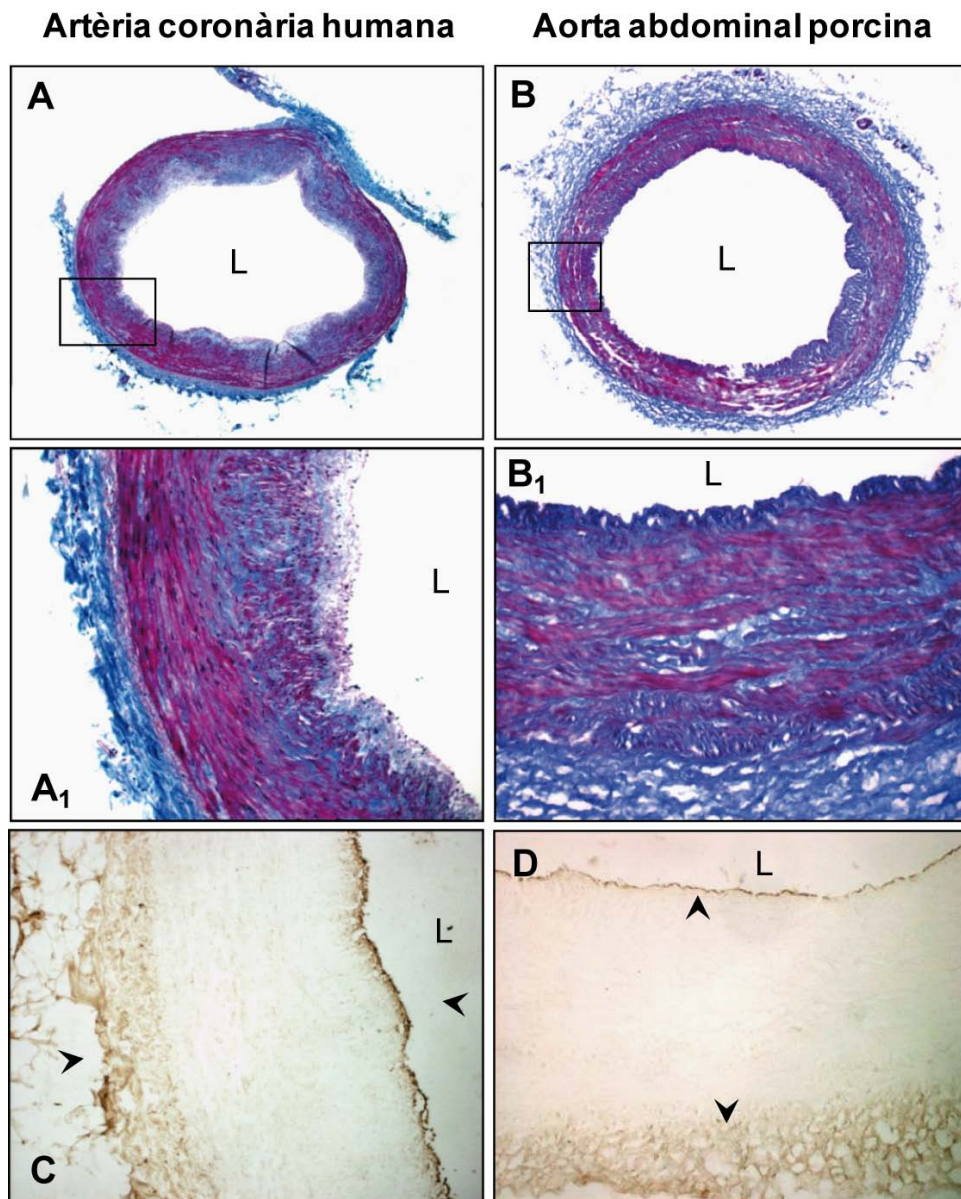


Figura 17. Patró d'expressió de la LOX a la paret arterial. Es van analitzar mostres d'artèria coronària humana (*A*, *A₁* i *C*) i d'aorta porcina (*B*, *B₁* i *D*). L'estructura vascular es va visualitzar per tinció tricròmica de Masson en talls transversals (imatges *A* i *B*). Les imatges *C* i *D* mostren el patró d'expressió de LOX analitzat per immuno-histoquímica amb un anticòs específic per a la LOX. Les fletxes indiquen l'expressió de la LOX a l'endoteli i a l'adventícia. Les imatges *A₁*, *B₁*, *C* i *D* corresponen a magnificacions de *A* i *B*.

A continuació vam voler establir el patró d'expressió dels diferents isoenzims de la família de les lisil oxidases en CMLV i CE en cultiu. Anàlogament a les observacions realitzades a la paret vascular, la LOX i la LOXL2 són les formes que s'expressen predominantment en cèl·lules endotelials (HUVEC) i CMLV humanes, en les que l'expressió de LOXL1 és minoritària, mentre que els nivells de LOXL3 i LOXL4 són pràcticament inapreciables.

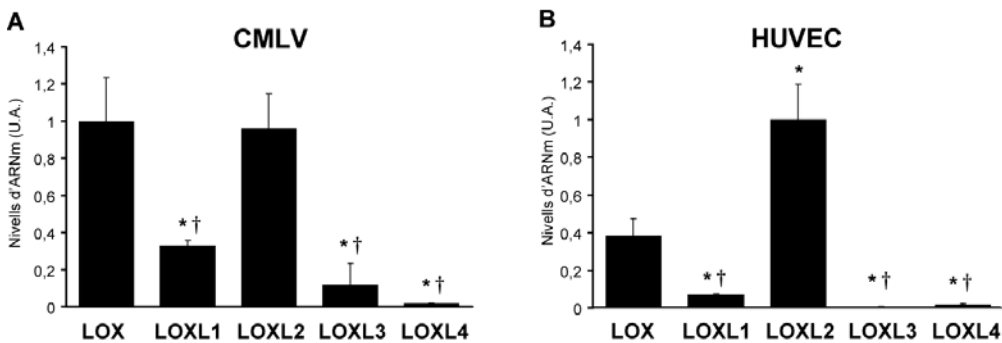


Figura 18. Patró d'expressió de les isoformes de LOX en cèl·lules vasculars humanes. Els nivells d'expressió relatius de les diferents isoformes de la família de les lisil oxidases s'analitzaren per PCR en temps real en CMLV procedents de 5 individus (A) i en HUVEC procedents de 5 *pools* de cèl·lules de com a mínim 10 individus (B). Els valors obtinguts es normalitzaren segons els nivells d'expressió de l'ARNr 18S. Els resultats s'expressen com a percentatge respecte al valor de l'isoenzim que presenta un nivell d'expressió més elevat en cada tipus cel·lular, i corresponen a la mitjana ± SEM (n=5; p<0,05: *, vs. LOX; †, vs. LOXL2).

1.2. La hipòxia indueix l'expressió de LOX en CE

Els estudis realitzats per Erler *et al.* mostren que la LOX es regula per hipòxia en cèl·lules canceroses, controlant-ne la progressió tumoral [219]. Tenint en compte que els nostres resultats previs demostren el paper de la LOX en el control de la funció endotelial, i que la hipòxia és un fenomen que té lloc en determinats estadis de la patologia ateroscleròtica, hem volgut analitzar si aquest estímul modula els nivells de LOX en CE. Amb aquesta finalitat, vam sotmetre CE humanes de vena de cordó umbilical (HUVEC) i CE d'aorta bovina (BAEC) a d'hipòxia (1% O₂) durant diferents temps i vam analitzar-ne els nivells d'ARNm per PCR en temps real. La hipòxia va induir els nivells de HIF-1α en BAEC (Fig. 19 A) i en HUVEC (no es mostra) de manera dependent del temps d'incubació, i va incrementar l'expressió de VEGF, un reconegut gen regulat per hipòxia (Fig. 19 B).

RESULTATS

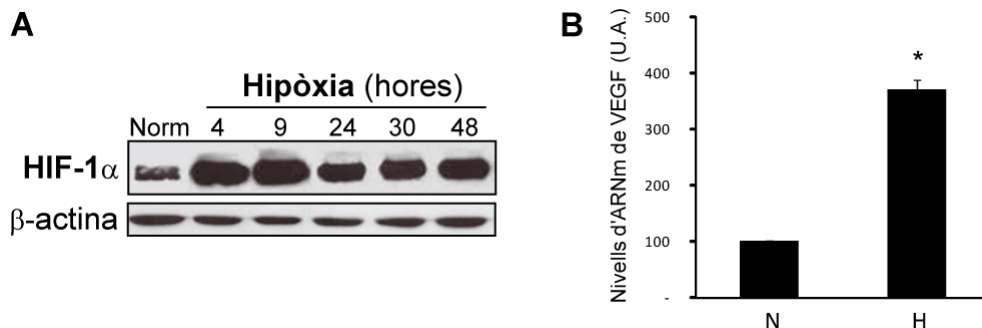


Figura 19. La hipòxia promou eficientment una resposta adaptativa en cèl·lules en cultiu. (A) Es van avaluar per *Western blot* els nivells proteics de HIF-1 α en els lisats cel·lulars de BAEC mantingudes en condicions de normòxia o hipòxia (1% O₂). Els nivells de β -actina s'utilitzaren com a control de càrrega. Es mostra una autoradiografia representativa de dos experiments independents realitzats per duplicat. **(B)** Es mostren els nivells relatius d'ARNm de VEGF respecte als de la TATA-binding protein (TBP) corresponents a cèl·lules HUVEC cultivades en condicions d'hipòxia (24 h) avaluats per PCR en temps real. *N*: normòxia, *H*: hipòxia. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm SEM (n=9; *, p<0,05: vs. cèl·lules incubades en normòxia).

Vam observar que la hipòxia indueix l'expressió de LOX de forma significativa en HUVEC i BAEC, després de 4 h d'exposició a l'estímul, i amb un màxim que s'assoleix a les 18 h de tractament (Fig. 20 A). La inducció de LOX per hipòxia es va reproduir en CE murines de pulmó (MLEC) (Fig. 20 B).

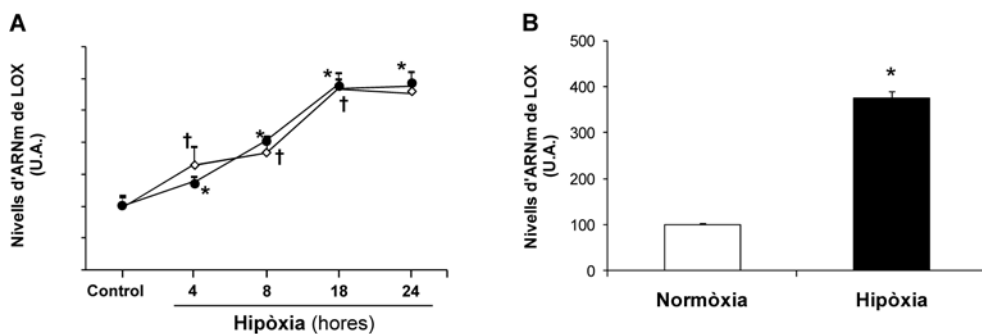


Figura 20. La hipòxia indueix l'expressió de LOX en CE. Els nivells d'ARNm de LOX s'analitzaren per PCR en temps real en HUVEC (cercles negres) i BAEC (rombes blancs) incubades en condicions d'hipòxia (1% O₂) a diferents temps (A), i de MLEC exposades a hipòxia durant 24 h (B). Els valors obtinguts es normalitzaren segons els nivells d'expressió de TBP. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm SEM [A: n=9; p<0,05: *, vs. HUVEC control [normòxia]; †, vs. BAEC control [normòxia]. B: n=8; p<0,0001: *, vs. cèl·lules control [normòxia]].

L'increment de l'expressió de LOX en CE sotmeses a hipòxia es va confirmar per immunocitoquímica (Fig. 21). Així mateix, la hipòxia va incrementar l'activitat de LOX avaluada en el sobrenedant cel·lular (Fig. 22).

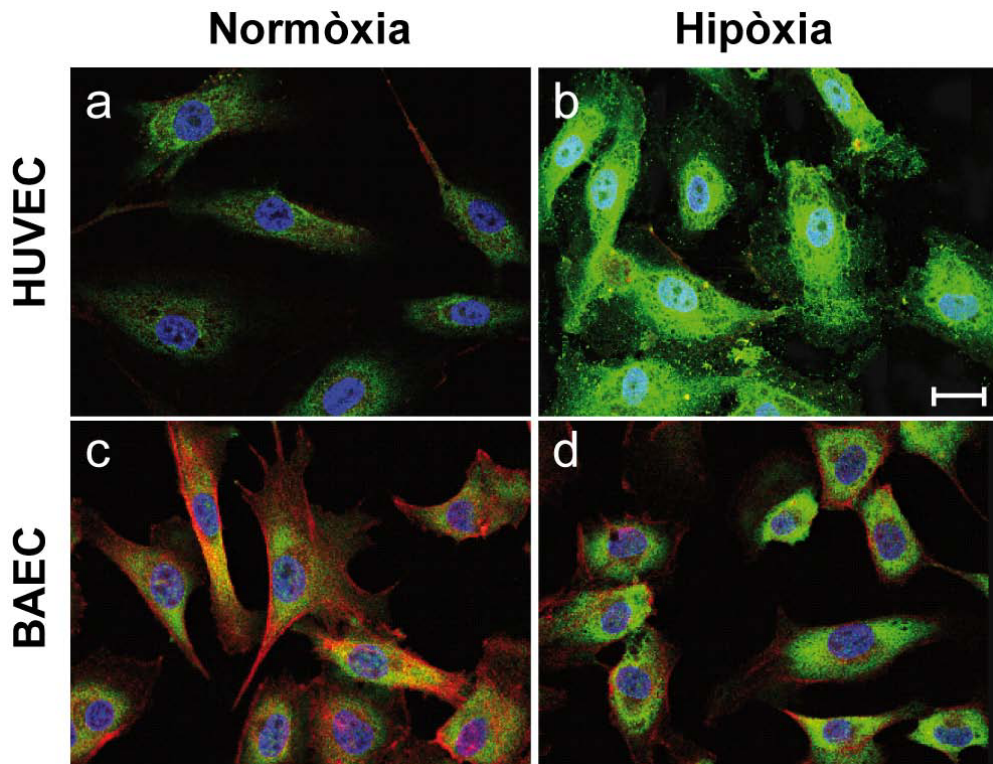


Figura 21. La hipòxia augmenta els nivells proteics de LOX en CE. L'expressió de LOX es va analitzar per immunocitoquímica en HUVEC i BAEC mantingudes en condicions de normòxia o hipòxia durant 48 h. El color verd mostra la localització de la LOX. Els nuclis es varen marcar amb Hoechst (blau), i la F-actina amb fal·loïdina (*Alexa Fluor 633*) (vermell). Barra: 10 μ m.

RESULTATS

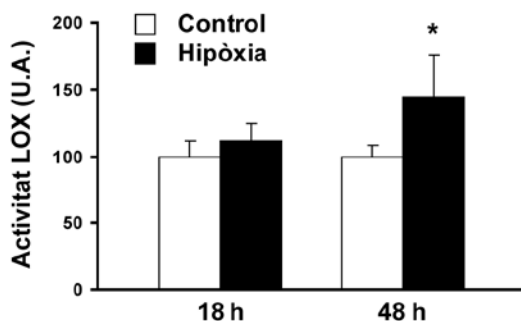


Figura 22. La hipòxia incrementa l'activitat lisil oxidasa en CE. Es van mantenir BAEC en condicions de normòxia i hipòxia durant 18 o 48 h, i el sobrenedant es va recollir per avaluar-ne l'activitat LOX. Els resultats es van normalitzar segons el contingut de proteïna cel·lular, i s'expressen com a mitjana \pm SEM (n=6; p<0,05: *, vs. cèl·lules control [normòxia]).

1.3. La inducció de la LOX per hipòxia és independent de factors autocrins

L'estímul hipòxic és un potent inductor de la secreció de factors de creixement en CE, com ara el VEGF. Per això, hem analitzat si els factors autocrins secretats per les cèl·lules incubades en condicions d'hipòxia són responsables de la inducció de LOX. En les nostres condicions, la hipòxia va induir fortament l'expressió de VEGF en HUVEC (Fig. 23 A). No obstant, el tractament d'aquestes cèl·lules amb VEGF (50 ng/ml) no va modificar els nivells d'ARNm de LOX (Fig. 23 B). Finalment, en incubar HUVEC amb sobrenedants de CE sotmeses a hipòxia, no s'observaren canvis en l'expressió de LOX (Fig. 23 C). Per tant, descartem la possibilitat que factors autocrins alliberats per les CE en resposta a la hipòxia siguin responsables de la regulació de LOX.

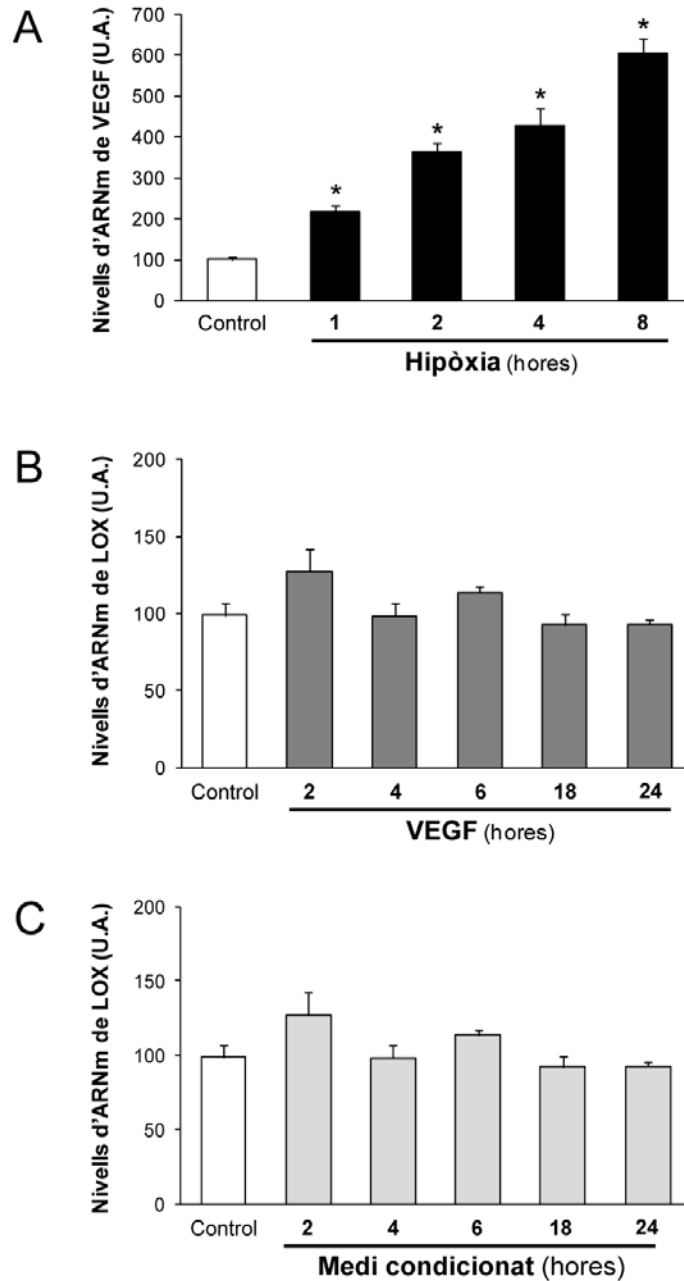


Figura 23. L'increment de l'expressió de LOX induïda per la hipòxia no està regulat per mecanismes autocrins. Es van avaluar els nivells d'ARNm de VEGF (A) i LOX (B i C) en HUVEC. Les cèl·lules es van sotmetre a condicions d'hipòxia (1% O₂) (A), es van tractar amb VEGF (50 ng/ml) (B) o amb els sobrenedants de cèl·lules mantingudes en condicions de normòxia (control) o hipòxia (18 h) (C) a diferents temps. Els resultats s'expressen com a mitjana ± SEM (n=9; p<0,05: *, vs. cèl·lules control).

RESULTATS

1.4. La hipòxia augmenta l'activitat transcripcional de LOX en CE

Per tal d'esbrinar si la regulació de la LOX per hipòxia en CE es produeix a través d'un mecanisme transcripcional, vàrem pretractar BAEC amb 5,6-dicloro-1-(β -D-ribofuranosil) benzimidazol (DRB), un inhibidor de la transcripció, 1 h abans de sotmetre-les a hipòxia durant 24 h. El DRB va inhibir l'increment dels nivells d'ARNm promogut per la hipòxia (Fig. 24 A). Per tal de confirmar la implicació d'un mecanisme transcripcional en aquest efecte, vam transfectar transitòriament BAEC amb un vector que conté un fragment de 821 pb del promotor de la LOX acoblat a luciferasa (pGL3/pLOX-821). L'activitat transcripcional d'aquest promotor va augmentar més de dues vegades en sotmetre les cèl·lules a hipòxia (18h) (Fig. 24 B). Aquests resultats indiquen que l'estímul hipòxic augmenta l'activitat transcripcional de LOX en CE.

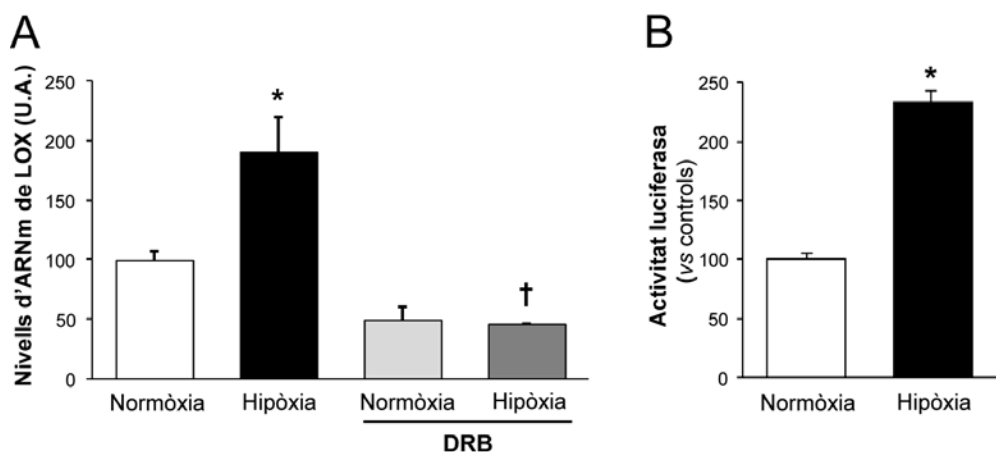


Figura 24. La hipòxia indueix l'activitat transcripcional de LOX. (A) Es van incubar BAEC en condicions de normòxia o hipòxia durant 24 h en presència o absència d'un inhibidor de la transcripció (DRB, 50 μ M). Els nivells d'ARNm de LOX es van avaluar per PCR en temps real i es normalitzaren segons els nivells d'expressió de TBP. **(B)** Les BAEC es van transfectar amb una construcció reportera del promotor de la LOX acoblat a luciferasa (pLOX-821) i es van incubar en condicions de normòxia o hipòxia durant 24 h. Les activitats luciferasa i β -galactosidasa es van analitzar tal i com es descriu a la secció de *Material i Mètodes*. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm SEM (n=9; p<0,05: *, vs. cèl·lules control [normòxia]; †, vs. cèl·lules incubades en hipòxia en absència de DRB).

1.5. L'eix PI3K/Akt/mTOR està involucrat en la inducció de LOX per hipòxia

Com ja hem descrit, HIF-1 és el factor de transcripció per excel·lència implicat en la regulació de l'expressió gènica en resposta a la hipòxia. Per tal de determinar la seva possible implicació en la inducció de l'expressió de la LOX per hipòxia, vam inhibir l'activitat prolil hidroxilasa mitjançant dimetiloxaliglicina (DMOG). El tractament amb aquest agent inhibeix la degradació proteosòmica de HIF-1 α , incrementant la seva concentració intracel·lular, mimetitzant així les condicions d'hipòxia (Fig. 25 A) [146]. Tal i com mostra la Fig. 25 B, el tractament de BAEC amb DMOG indueix l'expressió de LOX, si bé en menor grau a com ho fa la pròpia hipòxia, tot i que aquest compost indueix un major increment de proteïna HIF-1 α que la hipòxia per si sola.

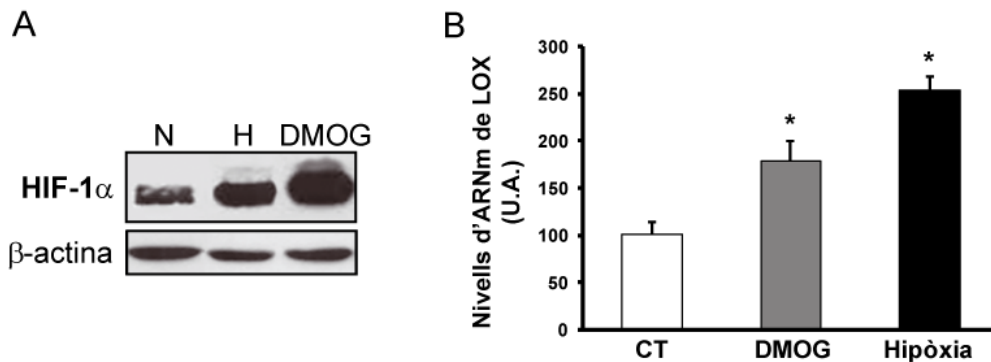


Figura 25. La DMOG incrementa els nivells d'ARNm de LOX. Les BAEC es van tractar amb DMOG (0,5 mM) durant 24 h o es van mantenir en condicions d'hipòxia durant 24 h. **(A)** Els nivells proteics de HIF-1 α s'analitzaren per *Western blot*. **(B)** Els nivells d'ARNm de LOX s'avaluaren per PCR en temps real i es normalitzaren segons els nivells d'expressió de TBP. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm SEM (n=6; p<0,05: *, vs. cèl·lules control [normòxia]).

L'eix PI3K/Akt/mTOR és la via de senyalització més important implicada en la inducció de HIF-1 α [124]. Per tal d'establir quin paper juga aquesta via en la inducció de LOX per hipòxia, vam tractar BAEC amb rapamicina (100 mM), un inhibidor de mTOR, 1 h abans d'exposar les cèl·lules a hipòxia (24 h). Mitjançant *Western blot* vam confirmar que, efectivament, la rapamicina bloqueja l'increment dels nivells proteics de HIF-1 α en hipòxia (Fig.26 A). No obstant, la rapamicina només va bloquejar parcialment l'increment dels nivells d'ARNm de LOX promogut per la hipòxia (Fig.26 B).

RESULTATS

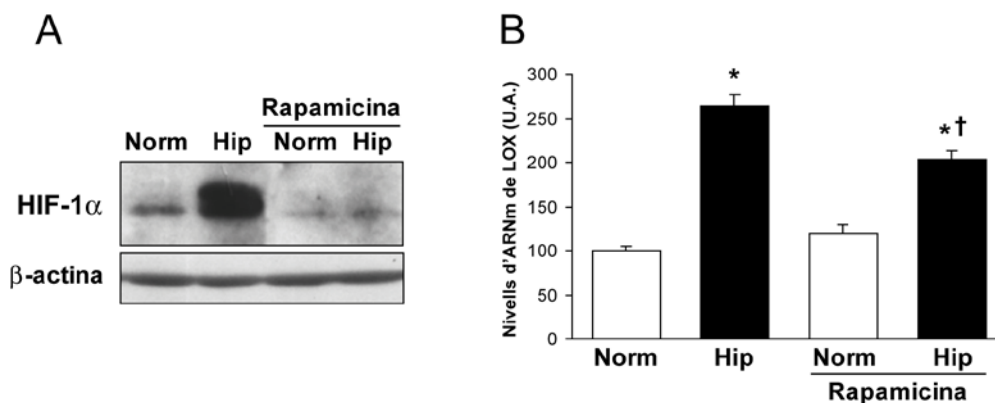


Figura 26. La via de senyalització de mTOR només està parcialment involucrada en la inducció de LOX per hipòxia en CE. Es van pre-incubar BAEC amb rapamicina (100 μ M) durant 1 h i es van exposar a normòxia (Norm, controls) o hipòxia (Hip; 1% O_2 , 24 h). **(A)** Els nivells proteics de HIF-1 α es van analitzar per Western blot. Com a control de càrrega es determinaren els nivells de β -actina. Es mostra l'autoradiografia d'un experiment representatiu (n=3). **(B)** Els nivells d'ARNm de LOX s'avaluaren per PCR en temps real i es normalitzaren segons els nivells d'expressió de TBP. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm SEM (n=9; p<0,05: *, vs. cèl·lules control [normòxia]; †, vs. cèl·lules incubades en hipòxia en absència de rapamicina).

1.6. La inhibició de HIF-1 α bloqueja parcialment la regulació de LOX per hipòxia

Els resultats obtinguts en els experiments amb rapamicina suggereixen que HIF-1 només intervé de forma secundària en la regulació de LOX per hipòxia. Per tal d'avaluar més a fons el paper d'aquest factor de transcripció, vam bloquejar l'expressió de HIF-1 α utilitzant un ARN d'interferència específic contra HIF-1 α (siHIF-1 α). Les HUVEC es transfectaren per nucleofecció amb el siHIF-1 α o amb un siRNA control (siRAND), i s'incubaren en condicions de normòxia o de hipòxia durant 24 h. El silenciament de HIF-1 α va reduir fortament els nivells d'ARNm de HIF-1 α i en va bloquejar l'increment dels nivells proteics induït per la hipòxia (Fig.27).

En aquestes condicions, el silenciament de HIF-1 α només va evitar parcialment la inducció de LOX per hipòxia (Fig.28). Aquests resultats, juntament amb els obtinguts amb la rapamicina, indiquen que HIF-1 α tindria un paper secundari en la inducció de LOX per hipòxia en CE, i suggereix que deuen haver-hi altres mecanismes implicats en aquest procés.

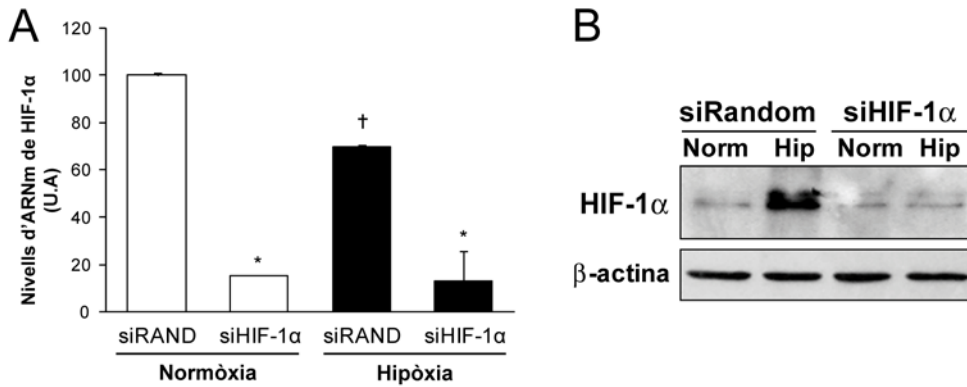


Figura 27. La transfecció de HUVEC amb un ARN d'interferència contra HIF-1α va bloquejar eficientment l'expressió de HIF-1α. Es transfectaren HUVEC amb un siRNA específic contra HIF-1α (siHIF-1α) o un siRNA control (siRandom), i s'incubaren en condicions de normòxia o hipòxia durant 24 h. **(A)** Els nivells d'ARNm de HIF-1α s'analitzaren per PCR en temps real i es normalitzaren segons els nivells d'expressió de TBP. Es mostren els resultats representatius d'un experiment realitzat per duplicat. Les dades s'expressen com a mitjana ± SEM (n=3; p<0,001: *, vs. siRAND en la mateixa condició experimental; †, vs. siRAND en normòxia). **(B)** Els assajos per *Western blot* confirmen que siHIF-1α bloqueja la inducció per hipòxia dels nivells proteics de HIF-1α.

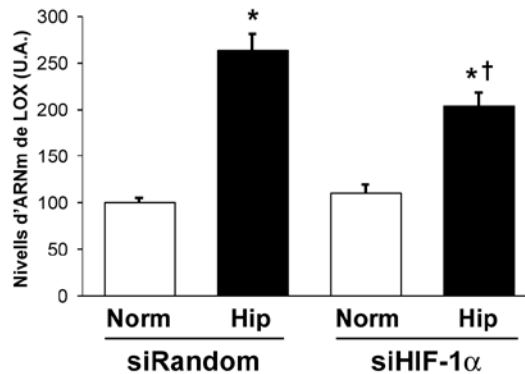


Figura 28. El silenciament de HIF-1α bloqueja parcialment la regulació de LOX per hipòxia en HUVEC. El silenciament de HIF-1α disminueix lleugerament l'increment dels nivells d'ARNm de LOX avaluats per PCR en temps real. Les dades es normalitzaren segons els nivells d'expressió de TBP. Els resultats s'expressen com a mitjana ± SEM (n=9; p<0,05: *, vs. cèl·lules normòxiques transfectades amb el mateix siRNA; †, vs. cèl·lules hipòxiques transfectades amb siRAND).

RESULTATS

1.7. Les ROS estan involucrades en la regulació de LOX per hipòxia

Recentment s'ha demostrat que l'estrès oxidatiu juga un paper important en la senyalització de la resposta a la hipòxia [175, 176, 425]. Per aquest motiu, hem volgut esbrinar si les ROS generades com a conseqüència de la hipòxia estan involucrades en la inducció de LOX. Amb aquest objectiu, vam pre-tractar HUVEC amb diferents inhibidors d'estrès oxidatiu durant 1 h abans de sotmetre-les a hipòxia o normòxia (Taula 6).

Taula 6. Inhibidors d'estrès oxidatiu utilitzats en els nostres estudis.

agent	efecte	concentració utilitzada
DPI	inhibició flavoenzims	5 μ M
rotenona	inhibició del transport d'electrons mitocondrial	2 μ M
catalasa	degradació de H ₂ O ₂	3000 U/ml
apocinina	inhibició de la NADPH oxidasa	100 μ M

Tal i com es mostra a la Fig. 29, l'increment dels nivells de LOX en hipòxia es va reduir significativament en les cèl·lules prèviament tractades amb DPI, rotenona, catalasa i apocinina. Aquest resultat recolza el paper de les ROS en la inducció de LOX per hipòxia en CE.

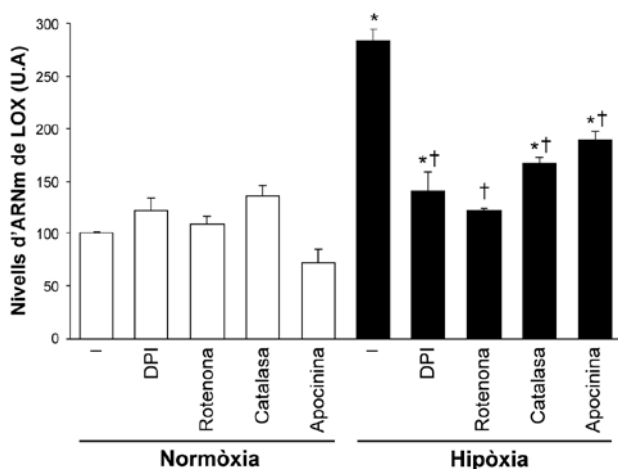


Figura 29. La senyalització via ROS està implicada en la inducció de LOX per hipòxia en CE. Les HUVEC es van pre-incubar amb inhibidors d'estrès oxidatiu i es van mantenir en condicions de normòxia o hipòxia durant 24 h (DPI, 5 μ M; Rotenona, 2 μ M; Catalasa, 3000 U/ml; Apocinina, 100 μ M). Els nivells d'ARNm de LOX es van determinar per PCR en temps real i es normalitzaren segons els nivells d'expressió de TBP. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm SEM (n=9; p<0,05: *, vs. cèl·lules control; †, vs. cèl·lules hipòxiques).

1.8. La via de senyalització de les proteïnes Smad està involucrada en l'increment de l'activitat transcripcional de LOX induïda per hipòxia

Per tal d'aprofundir en el mecanisme transcripcional implicat en la inducció de LOX per hipòxia en CE i precisar més acuradament quina és la contribució de HIF-1 α , es van abordar dues estratègies experimentals. Primerament, partint de la construcció pLOX-821, es va mutagenitzar l'element de resposta a hipòxia (HRE) descrit prèviament i situat a -75 pb del promotor de LOX (HRE/-75) [219]. Aquesta mutació va provocar una disminució de l'activitat basal del promotor de LOX, però es va mantenir una inducció significativa de la seva activitat transcripcional en resposta a la hipòxia (Fig. 30 A).

A continuació es va realitzar un estudi de deleccions seriades del promotor. Amb aquest objectiu i a partir de la construcció pLOX-821, es van generar dues construccions més per PCR, les quals contenen 405 i 132 pb de la regió proximal del promotor de la LOX (pLOX-405 i pLOX-132, respectivament). Tal i com s'observa a la Fig. 30 B, l'estudi de deleccions seriades ens va permetre acotar una regió del promotor de LOX situada entre -821 i -405 pb involucrada en la inducció de LOX per hipòxia, tot i que aquesta regió no conté l'HRE prèviament descrit.

Vam analitzar *in silico* aquesta regió i no hi vam trobar cap element putatiu HRE, però sí diversos elements d'unió a Smad (SBE). De fet, les proteïnes Smad participen en la senyalització de les respostes a la hipòxia en CE [426], i per aquest motiu vam voler analitzar la seva capacitat de modular l'activitat transcripcional de LOX. Amb aquesta finalitat, vam co-transfectar BAEC amb la construcció pLOX-821 i diferents vectors d'expressió de proteïnes Smad (2, 3 o 4) [427], i vam cultivar aquestes cèl·lules en condicions de normòxia o d'hipòxia. Els resultats mostrats a la Fig. 31 indiquen que la sobre-expressió de proteïnes Smad va potenciar la inducció transcripcional de la LOX en resposta a la hipòxia, mentre que no va tenir conseqüències en condicions de normòxia. Aquests resultats recolzen la hipòtesi que les proteïnes Smad participen en la senyalització que promou l'activació del promotor de LOX en hipòxia.

RESULTATS

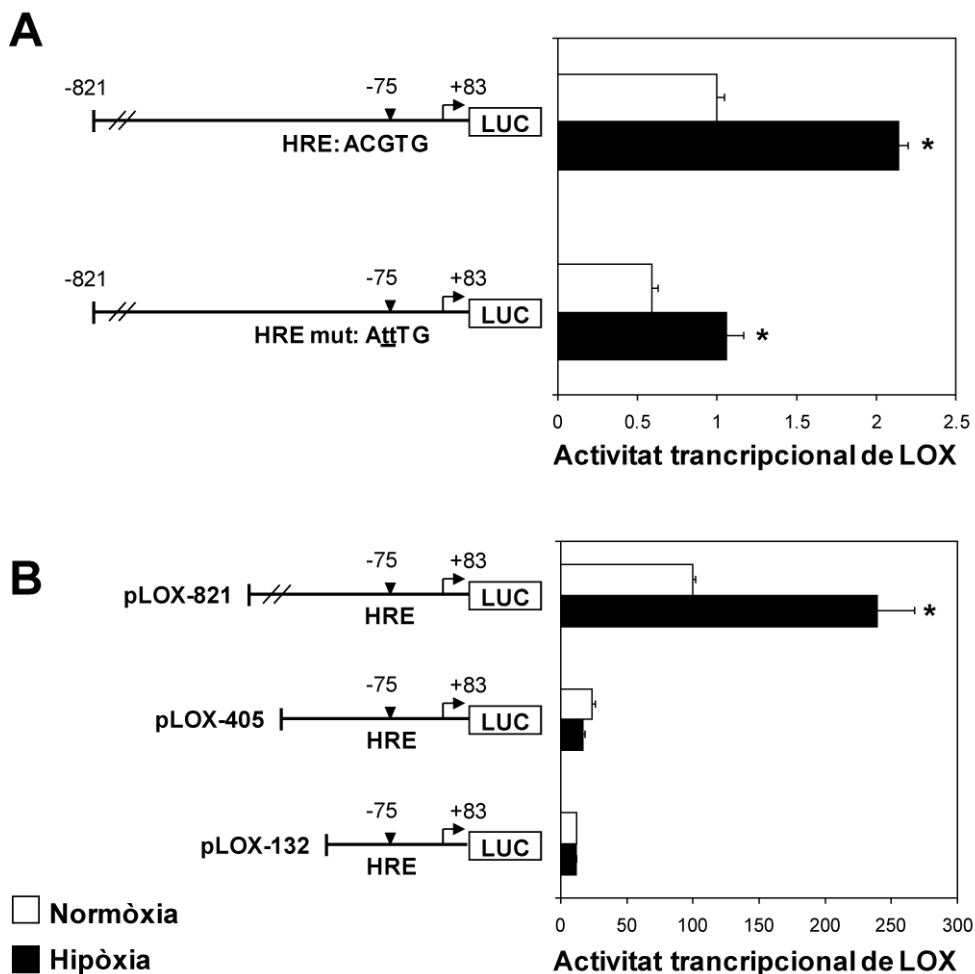


Figura 30. La inducció per hipòxia de l'activitat transcripcional de LOX només depèn parcialment del HRE prèviament identificat (HRE/-75). (A) Les BAEC es van transfectar amb la construcció pLOX-821 nativa o mutagenitzada en l'element HRE, i es van incubar en condicions de normòxia o hipòxia. Les cèl·lules es van lisar per tal de determinar-ne l'activitat luciferasa, que es va normalitzar segons l'activitat β -galactosidasa. Es mostra, esquematitzada, la regió del promotor de la LOX analitzada en els estudis de transfecció transitòria, així com la seqüència de l'element HRE putatiu i els canvis introduïts per mutagènesi. (B) Es va realitzar un estudi de deleccions seriadetes del promotor, utilitzant les construccions reporteres per a la luciferasa pLOX-821, pLOX-405 i pLOX-132. S'hi indica la posició del HRE. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm SEM (n=9; p<0,05: *, vs. la mateixa construcció en normòxia).

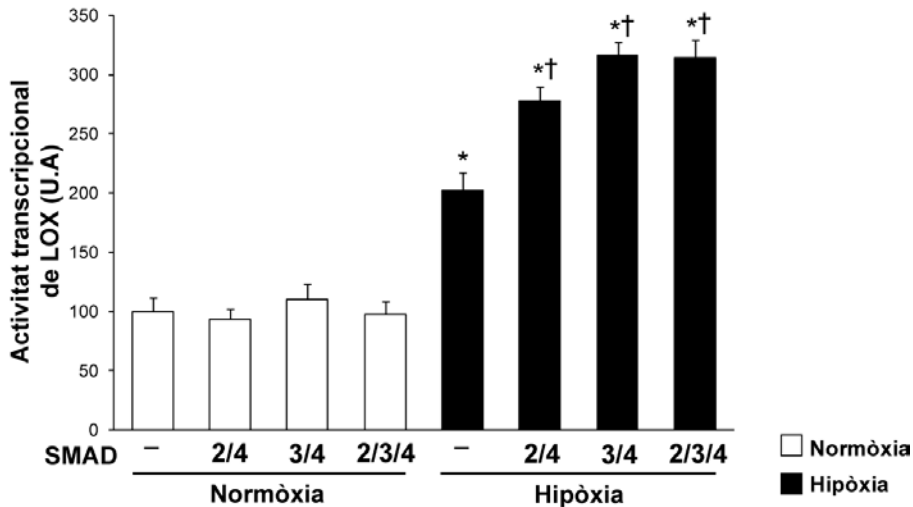


Figura 31. La via de senyalització Smad està involucrada en l'increment de l'activitat transcripcional de LOX induïda per hipòxia. Les BAEC es van co-transfectar amb la construcció pLOX-821 i amb els vectors d'expressió per a Smad2 i/o Smad3 juntament amb Smad4, o el corresponent vector buit (*pcDNA3*), i es van incubar en condicions de normòxia o hipòxia. Els resultats s'expressen com a mitjana ± SEM (n=9; p<0,05: *, vs. cèl·lules incubades en normòxia; †, vs. cèl·lules co-transfectades amb el vector pcDNA3 buit [-] i incubades en hipòxia).

1.9. La hipòxia sistèmica indueix la LOX en teixits vascularitzats

Per tal de comprovar que la regulació de la LOX per hipòxia observada en cultius cel·lulars també es dona *in vivo*, vam mantenir ratolins mascles de la soca C57BL/6J de 2 mesos d'edat en condicions d'hipòxia (10% O₂) durant 24 o 48 h. A continuació, els animals es sacrificaren i se n'extragueren diversos teixits (pulmó, cor, ronyó, i cervell), dels quals se n'obtingué ARN. Per tal de confirmar que en les nostres condicions experimentals s'estava assolint una hipòxia tissular, es van analitzar per PCR en temps real els nivells d'ARNm d'eritropoietina (EPO) en cervell i ronyó, teixits en els que la inducció d'aquesta proteïna per hipòxia està clarament establerta [428]. Tal i com s'observa a la Fig. 32, l'expressió d'EPO s'incrementà en ambdós teixits en un grau similar al descrit prèviament, validant les nostres condicions experimentals.

RESULTATS

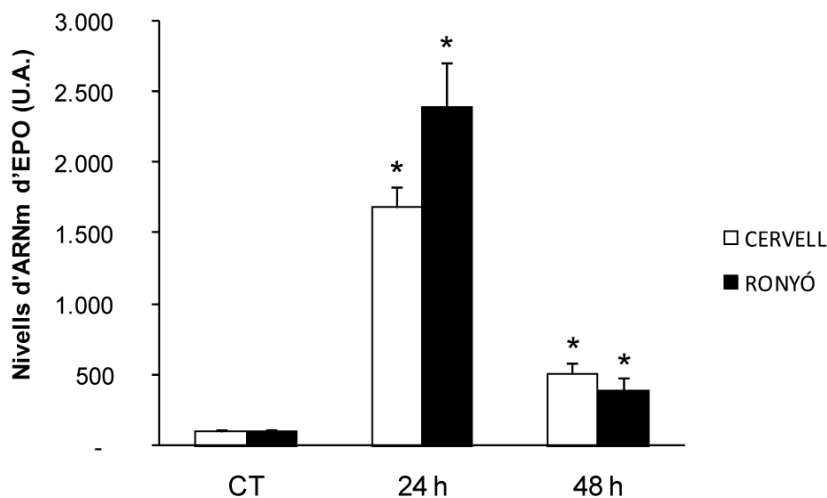


Figura 32. La hipòxia sistèmica indueix l'expressió d'eritropoietina en cervell i ronyó. Es mantingueren ratolins establats en condicions d'hipòxia (10% O₂) durant 24 i 48 h. Els nivells d'expressió d'EPO en cervell i ronyó s'analitzaren per PCR en temps real i es normalitzaren segons els nivells d'expressió de l'ARNr 18S. Les dades s'expressen com a mitjana ± SEM (CT, n=18; 24 h, n= 8; 48 h, n=7; *, p<0,05, vs. CT).

En aquestes condicions experimentals, l'expressió de LOX i LOXL2, les isoformes més expressades a la paret vascular, es va modular en teixits vascularitzats. La LOX es va induir significativament en pulmó i cor, mentre que la LOXL2 ho va fer en cervell i pulmó (Fig. 33).

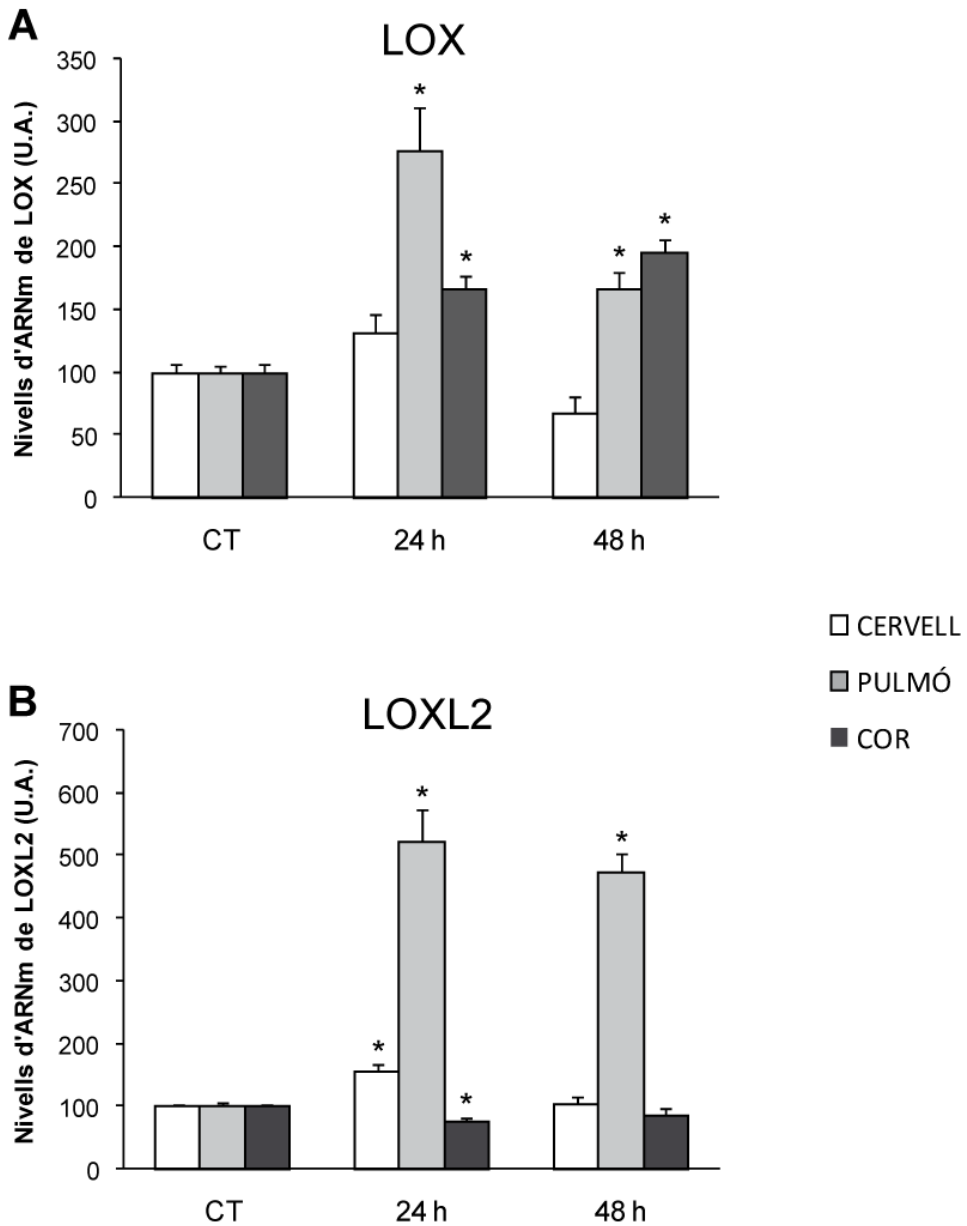


Figura 33. La hipòxia sistèmica indueix l'expressió de LOX i LOXL2. Es mantingueren ratolins establats en condicions d'hipòxia (10% O₂) durant 24 i 48 h. Els nivells d'expressió de LOX (A) i LOXL2 (B) en cervell, pulmó i cor s'analitzaren per PCR en temps real i es normalitzaren segons els nivells d'expressió de l'ARNr 18S. Els resultats s'expressen com a mitjana ± SEM (CT, n=18; 24 h, n= 8; 48 h, n=7; *, p<0,05: vs. CT).

RESULTATS

2. ANÀLISI DE LA REGULACIÓ DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA PER LA LOX

Els resultats previs del nostre grup suggereixen que la inhibició de la LOX pot estar implicada en la disfunció endotelial desencadenada per factors de risc ateroescleròtic i citocines pro-inflamatòries [255, 257, 259, 313] i, per tant, que aquest enzim podria contribuir al desenvolupament de patologies vasculars com l'aneurisma i l'aterosclerosi [199, 429, 430]. La LOX s'ha localitzat en el nucli de cèl·lules vasculars, on controlaria l'expressió gènica. No obstant, hi ha un gran desconeixement sobre quins processos biològics controla la LOX i quins gens regula en cèl·lules vasculars. Per aquest motiu, hem volgut analitzar com afecta la sobre-expressió de LOX al patró d'expressió gènica en CE humanes mitjançant *microarrays*.

2.1. Sobre-expressió de la LOX en HUVEC mitjançant un sistema lentiviral

Per tal de sobre-expressar la LOX en CE, es va generar un vector d'expressió lentiviral clonant l'ADNc de la LOX humana en el plasmidi pLVX-Puro (pLVX/LOX) per tal de produir partícules víriques amb les que s'infectaren HUVEC. Com a controls es van utilitzar les construccions pLVX/GFP (que sobre-expressa la proteïna verda fluorescent GFP) i el corresponent vector buit (pLVX-Puro). La sobre-expressió de LOX en HUVEC mitjançant aquesta estratègia va incrementar l'expressió d'aquesta proteïna més de 20 vegades (Fig. 34 A). Per contra, la sobre-expressió de LOX no va afectar al nivell d'ARNm de les altres isoformes de la família de les lisil oxidases ni tampoc de la BMP-1 (Fig. 34 B). Paral·lelament, l'increment dels nivells d'ARNm de LOX va anar acompanyat d'un increment dels seus nivells proteics. L'anàlisi per *Western blot* del lisat cel·lular de HUVEC transduïdes amb el vector de LOX mostrà un augment molt significatiu tant del nivell de la forma madura de LOX com del proenzim (proLOX), en comparació amb les cèl·lules transduïdes amb el vector buit. Anàlogament, la sobre-expressió de LOX es va traduir en un augment de la proteïna secretada al medi de cultiu tant de la forma madura com del proenzim (Fig. 35).

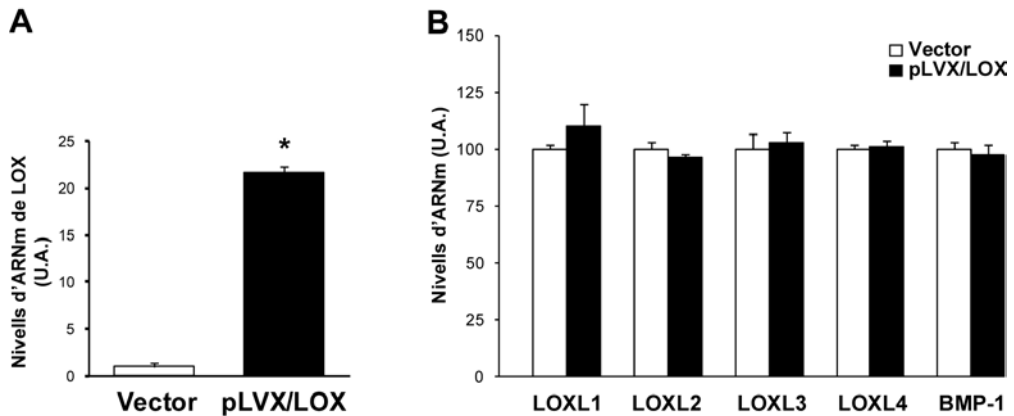


Figura 34. El sistema de transducció lentiviral amb la construcció pLVX/LOX incrementa eficientment l'expressió de LOX en HUVEC. Les HUVEC es van transduir amb el vector lentiviral buit (*vector*, pLVX-Puro) o amb el pLVX/LOX. Els nivells d'ARNm de LOX (A), de les seves isoformes (B), i de la BMP-1 (B) es van determinar per PCR en temps real i es van normalitzar segons els nivells d'expressió de la TBP. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm SEM (n=3; *, p<0,05: vs. cèl·lules infectades amb el vector buit).

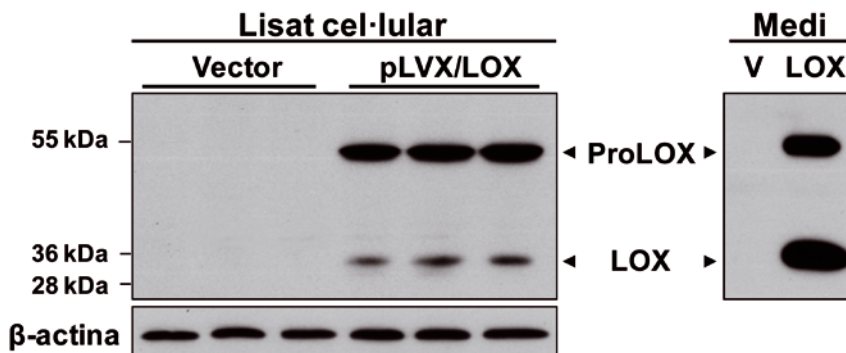


Figura 35. El sistema de transducció lentiviral incrementa els nivells proteics de LOX a nivell intra i extracel·lular en HUVEC. La sobre-expressió de LOX va incrementar tant el nivell de proenzim (*proLOX*; 50-55 kDa) com de LOX madura (*LOX*; 32kDa). Aquest augment s'observà tant a l'extracte cel·lular total com al medi de cultiu. Com a control de càrrega dels extractes cel·lulars, es mostren els nivells de β -actina.

RESULTATS

2.2. Anàlisi per *microarrays*

Amb l'objectiu d'analitzar les conseqüències de la sobre-expressió de LOX en HUVEC, vam utilitzar el sistema de *microarrays* d'Affymetrix (*GeneChip™ Gene 1.0 ST Array*). Els resultats es van analitzar amb el programa *Partek Genomics Suite*. Els p-valors generats van ser corregits mitjançant el mètode de Benjamini & Hochberg amb un punt de tall del 20%. Es van considerar significatius canvis en l'expressió gènica superiors a 1,5 vegades i inferiors a 0,5 per a un valor de *FDR* de 0,1. D'aquesta manera es va obtenir un llistat de 62 gens diferencialment modulats per la sobre-expressió de LOX. L'anàlisi funcional per categories o grups va revelar la modificació significativa de gens implicats en senyalització cel·lular, comunicació cèl·lula-cèl·lula, gens de resposta a estímuls i adhesió cel·lular (Fig. 36).

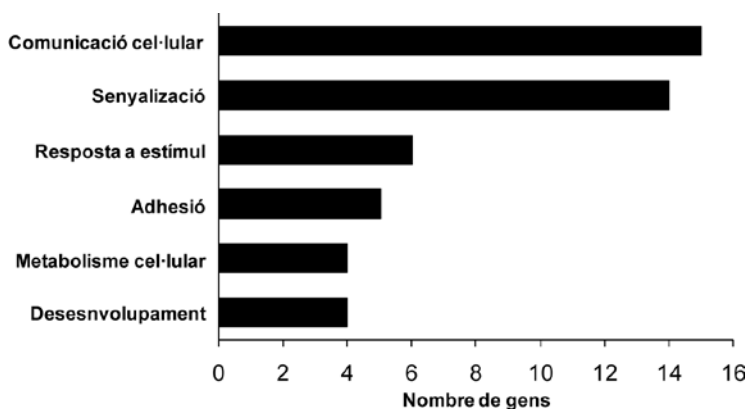


Figura 36. La sobre-expressió de LOX en HUVEC altera diversos processos biològics. S'indica el nombre de gens regulats per a cada procés en base a l'anàlisi de les dades de l'estudi per *microarray* realitzat amb el programa *Partek Genomics Suite* sobre la base de dades *Gene Ontology (GO)*.

D'entre els gens més significativament alterats per la sobre-expressió de LOX hi trobem l' α_2 -macroglobulina (A2M), l'expressió de la qual s'inhibeix significativament. Aquesta regulació es va verificar mitjançant PCR en temps real, en un estudi que va incloure les mostres utilitzades per a l'estudi de *microarray* i mostres generades en una nova infecció. Tal i com s'observa a la Fig. 37, l'anàlisi per PCR en temps real demostra que l'expressió de l'A2M es va reduir en un 80% com a conseqüència de la sobre-expressió de LOX.

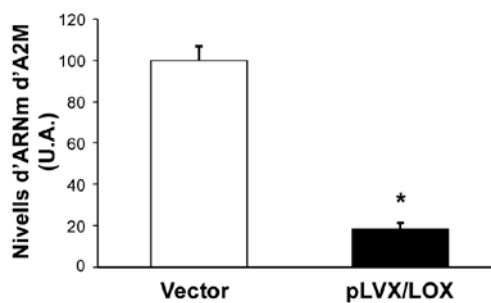


Figura 37. La sobre-expressió de LOX redueix l'expressió de l'A2M en HUVEC. Les HUVEC es van transduir amb el vector lentiviral buit (*vector*, pLVX-Puro) o amb el pLVX/LOX. Els nivells d'ARNm d'A2M es van determinar per PCR en temps real i es van normalitzar segons els nivells d'expressió de la TBP. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm SEM (n=6; *, p<0,05: vs. cèl·lules infectades amb el vector buit).

RESULTATS

RESULTATS

RESULTATS

4. ESTUDI DE LA REGULACIÓ DE LA FBLN5 PER HIPÒXIA I DELS MECANISMES IMPLICATS

La FBLN5 participa en la regulació de la funció de les CE [368, 373, 374, 397, 406], no obstant, es disposa de poca informació respecte als mecanismes de regulació d'aquesta proteïna en cèl·lules vasculares. Donat que el paper de la FBLN5 en l'elastogènesi i el manteniment de la MEC està íntimament lligat a l'activitat lisil oxidasa, en aquest treball hem volgut establir si la hipòxia també pot modular la FBLN5 en CE i caracteritzar quina podria ser la seva conseqüència funcional.

4.1. La hipòxia indueix l'expressió de la FBLN5 en CE

En les nostres condicions experimentals, en les que la hipòxia augmenta el nivell de proteïna HIF-1 α i l'expressió de VEGF en CE (Fig. 19), vam observar que la hipòxia (1% O₂) indueix l'expressió de la FBLN5 en BAEC de manera dependent del temps. Els nivells de FBLN5 van augmentar progressivament des de les 4 h fins a assolir una inducció màxima d'aproximadament 2,5 vegades a les 24-48 h d'hipòxia (Fig. 44). De manera similar, la DMOG indueix notablement l'expressió de la FBLN5 en CE (Fig. 44).

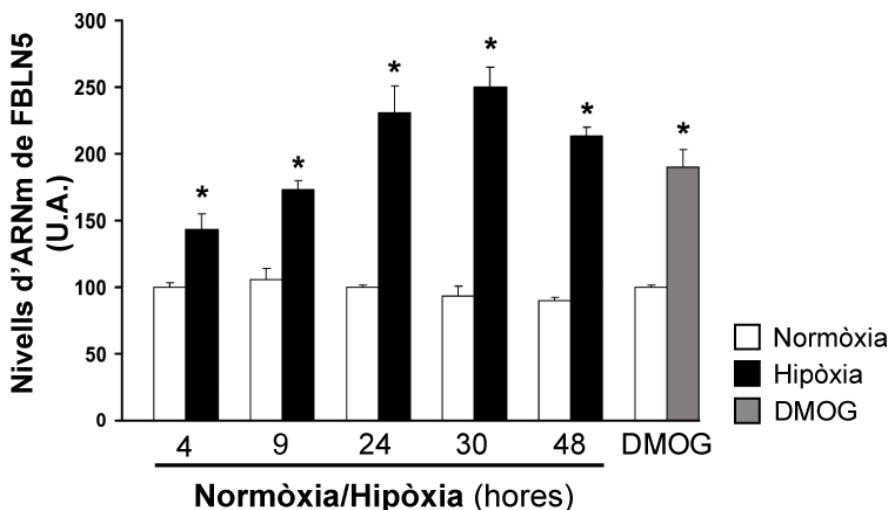


Figura 44. La hipòxia incrementa els nivells de FBLN5 en CE de manera dependent del temps. Es van mantenir BAEC en cultiu en condicions de normòxia o hipòxia (1% O₂) durant els temps indicats, o es van tractar amb DMOG (0,5 mM) durant 24 h. Els nivells d'ARNm de la FBLN5 s'avaluaren per PCR en temps real i es normalitzaren segons els nivells d'expressió de la TBP. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm SEM (n=9; *, p<0,05: vs. cèl·lules incubades en normòxia).

RESULTATS

La inducció de la FBLN5 per hipòxia també s'observà en CE de pulmó de ratolí (MLEC) i CE humanes HUVEC, així com en la línia cel·lular epitelial HeLa (Fig. 45), indicant que aquesta regulació no és exclusiva de les CE.

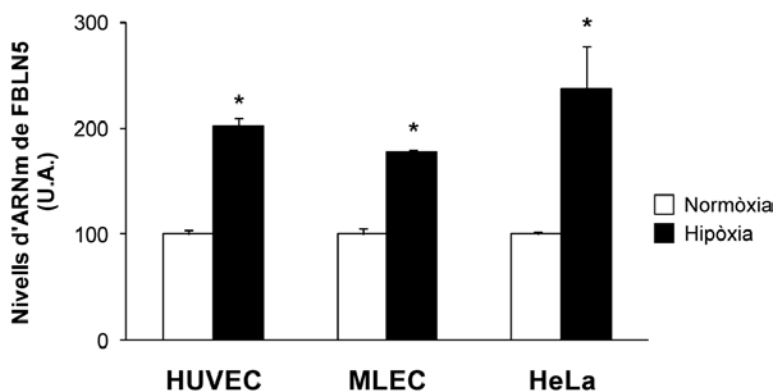


Figura 45. La inducció de la FBLN5 per hipòxia no és exclusiva de les CE. S'analitzaren els nivells d'ARNm de FBLN5 en HUVEC, MLEC, i HeLa incubades en condicions de normòxia o hipòxia durant 24 h. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm SEM (n=9; *, p<0,05: vs. cèl·lules incubades en normòxia).

Anàlogament, l'anàlisi per *Western blot* en lisats cel·lulars mostra que, tant en HUVEC com en HeLa, l'exposició a hipòxia va comportar un augment dels nivells proteics de FBLN5. La hipòxia també incrementà la secreció de FBLN5 a l'espai extracel·lular, tal i com es deriva de l'anàlisi per *Western blot* dels sobrenedants cel·lulars. L'estudi per immunocitoquímica mostra que aquesta proteïna es localitza principalment a la regió perinuclear i a la perifèria cel·lular, i evidencia també l'increment de FBLN5 tant a nivell intracel·lular (cèl·lules permeabilitzades) com extracel·lular (cèl·lules no permeabilitzades) (Fig. 46).

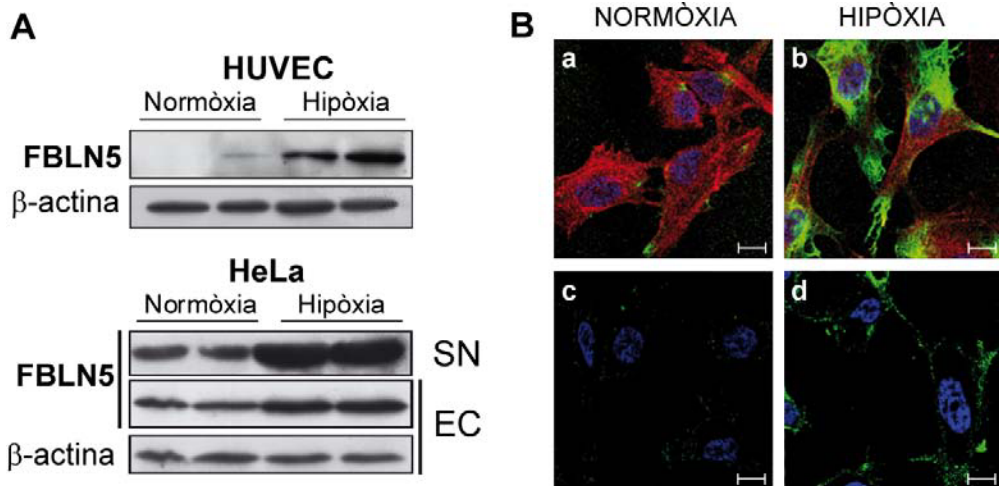


Figura 46. La hipòxia incrementa els nivells proteics de FBLN5 a nivell intracel·lular i extracel·lular. (A) Es van mantenir HUVEC i HeLa en normòxia o hipòxia durant 24 h. Els nivells proteics de FBLN5 dels extractes cel·lulars (EC) o dels sobrenedants (SN) de les cèl·lules en cultiu s'analitzaren per *Western blot*. Els nivells de β-actina s'utilitzaren com a control de càrrega. Es mostra una autoradiografia representativa de tres experiments independents realitzats per duplicat. **(B)** La localització de FBLN5 es va analitzar per immunocitoquímica en HUVEC mantingudes en normòxia (a, c) o sotmeses a hipòxia (b, d) durant 24 h. En cèl·lules permeabilitzades, la FBLN5 (verd) es va detectar a la regió perinuclear i a la perifèria cel·lular (a i b). La localització extracel·lular s'analitzà en cèl·lules sense permeabilitzar (c i d). Els nuclis es tenyiren amb Hoechst (blau), i els filaments de F-actina amb fal·loïdina (*Alexa Fluor 633*) (vermell) per tal de facilitar la visualització de les cèl·lules. Barres: 10 μm.

4.2. L'eix PI3K/Akt/mTOR està implicat en la inducció de la FBLN5 per hipòxia

Com ja hem indicat, l'eix PI3K/Akt/mTOR està implicat en la regulació dels nivells proteics de HIF-1 [124]. Per tal de definir el paper d'aquesta via de senyalització en la inducció de la FBLN5 per hipòxia, hem examinat l'efecte d'inhibidors específics de PI3K (LY294002) i mTOR (rapamicina). L'anàlisi per *Western blot* confirma que ambdós inhibidors bloquegen la inducció de HIF-1α per hipòxia (Fig. 47 A). Cap d'aquests inhibidors alterà els nivells proteics de HIF-1α ni l'expressió de FBLN5 en condicions basals (normòxia; dades no mostrades). L'anàlisi dels nivells d'ARNm de la FBLN5 per PCR en temps real mostra que el tractament amb aquests inhibidors va impedir la seva inducció per hipòxia (Fig. 47 B). Aquests resultats posen de manifest la implicació de l'eix PI3K/Akt/mTOR en la regulació de la FBLN5 per hipòxia.

RESULTATS

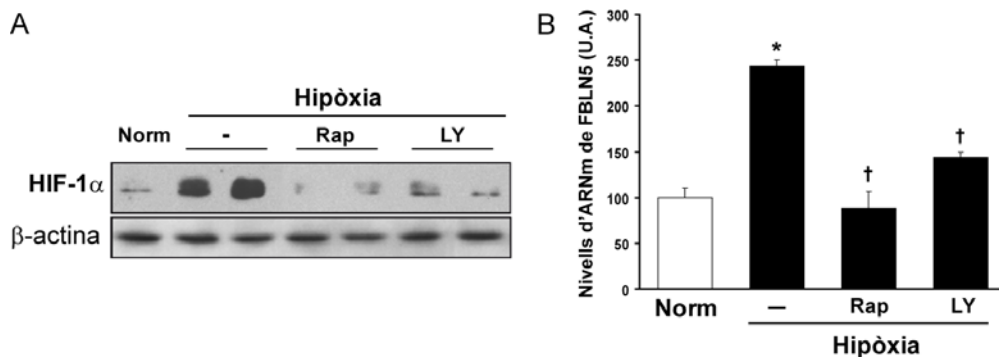


Figura 47. L'eix PI3K/Akt/mTOR està implicat en l'increment de l'expressió de la FBLN5 induït per hipòxia. Es varen pre-incubar BAEC amb rapamicina (*Rap*; 100 nM) o LY294002 (*LY*; 10µM) durant 1 h i es varen mantenir en condicions de normoxia (*Norm*, controls) o hipòxia durant 24 h. **(A)** Els nivells proteics de HIF-1α s'analitzaren per *Western blot*. Els nivells de β-actina s'utilitzaren com a control de càrrega. Es mostra un autoradiograma representatiu de tres experiments diferents realitzats per duplicat. **(B)** Els nivells d'ARNm de la FBLN5 s'avaluaren per PCR en temps real. Els resultats s'expressen com a mitjana ± SEM (n=9; p<0,05: *, vs. cèl·lules control; †, vs. cèl·lules incubades en hipòxia).

4.3. La inhibició de HIF-1α reverteix la inducció de la FBLN5 per hipòxia

Per tal de caracteritzar la implicació de HIF-1α en la regulació de la FBLN5, es varen analitzar les conseqüències de la inhibició d'aquest factor de transcripció mitjançant l'ús d'un siRNA específic (siHIF-1α). Aquesta estratègia, com ja havíem demostrat (Fig. 27), redueix els nivells d'ARNm de HIF-1α i n'evita l'augment dels nivells proteics per hipòxia (Figs. 48 A i B). La inhibició de HIF-1α féu disminuir significativament l'increment dels nivells d'ARNm i de proteïna de la FBLN5 induït per hipòxia (Figs. 48 C i D). Tal i com era d'esperar, el siHIF-1α va bloquejar la inducció per hipòxia del VEGF, un reconegut gen diana de HIF-1 (Fig. 48 C). L'efecte del siHIF-1α va ser específic i no va afectar l'expressió de HIF-2α en condicions basals (Fig. 48 A) ni la seva inducció en hipòxia (Fig. 48 B). Tal i com s'ha descrit [439], la inducció per hipòxia dels nivells de HIF-2α en HUVEC és significativament menor que la inducció de HIF-1α (Fig. 48 B), fet que suggereix que aquest darrer deu tenir un paper primordial en la regulació de la FBLN5. De fet, la inhibició específica de HIF-2α (Fig. 49 A) no va alterar la inducció de la FBLN5 per hipòxia (Figs. 49 B i C), reforçant aquesta hipòtesi.

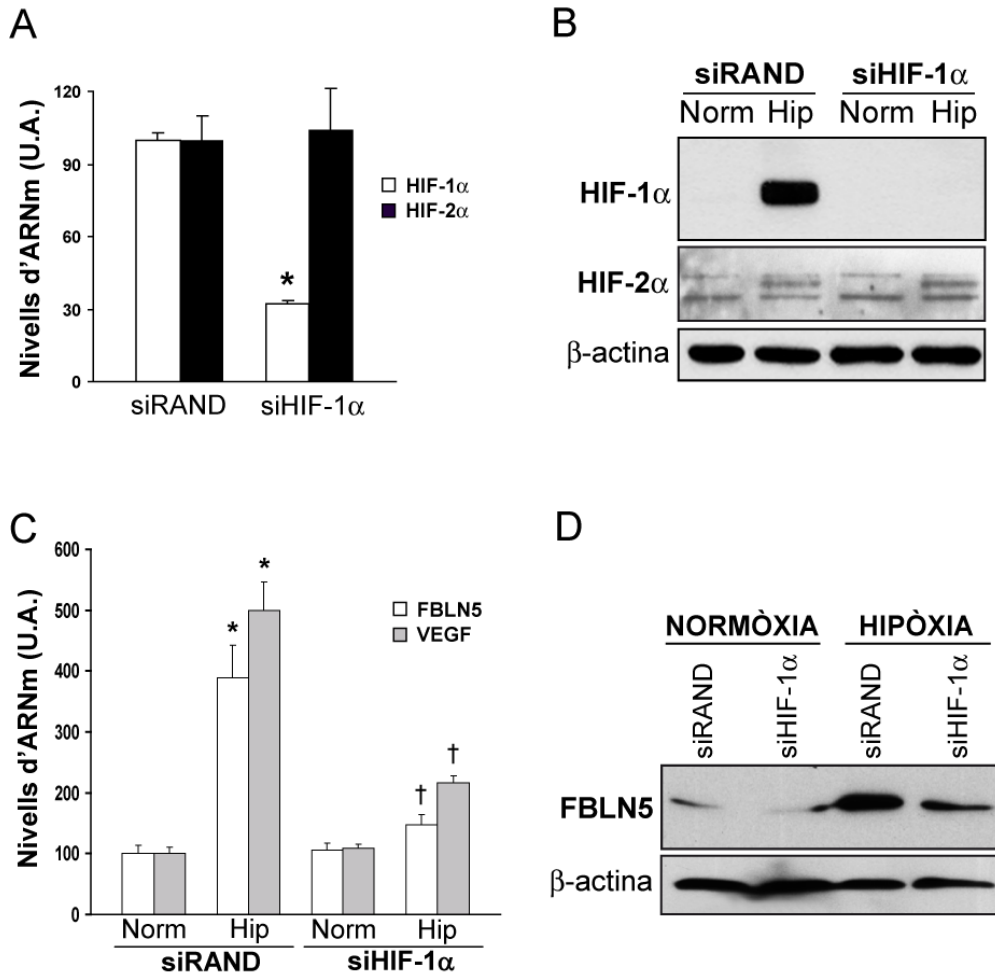


Figura 48. La inhibició específica de HIF-1α bloqueja la inducció de la FBN5 per hipòxia. (A) Es van transfectar HUVEC amb un siRNA específic contra HIF-1α (siHIF-1α) o amb un siRNA control (siRAND), i se'n determinaren els nivells d'ARNm de HIF-1α i HIF-2α per PCR en temps real. Els resultats s'expressen com a mitjana ± SEM (n=6; *, p<0,05: vs. cèl·lules transfectades amb siRAND). (B) L'anàlisi per *Western blot* confirmà que siHIF-1α bloqueja la inducció dels nivells proteics de HIF-1α per hipòxia, mentre que l'expressió de HIF-2α es manté invariable (*Norm*, normòxia; *Hip*, hipòxia). (C) La inhibició de HIF-1α evita la inducció per hipòxia dels nivells d'ARNm de FBN5 i VEGF, avaluats per PCR en temps real. Els resultats s'expressen com a mitjana ± SEM (n=9; p<0,05: *, vs. cèl·lules en normòxia transfectades amb siRAND; †, vs. cèl·lules en hipòxia transfectades amb siRAND). (D) S'analizaren els nivells proteics de FBN5 en HUVEC transfectades amb siHIF-1α o amb un siRNA control (siRAND) i incubades en condicions de normòxia o hipòxia. Es mostra un experiment representatiu de *Western blot* (n=2).

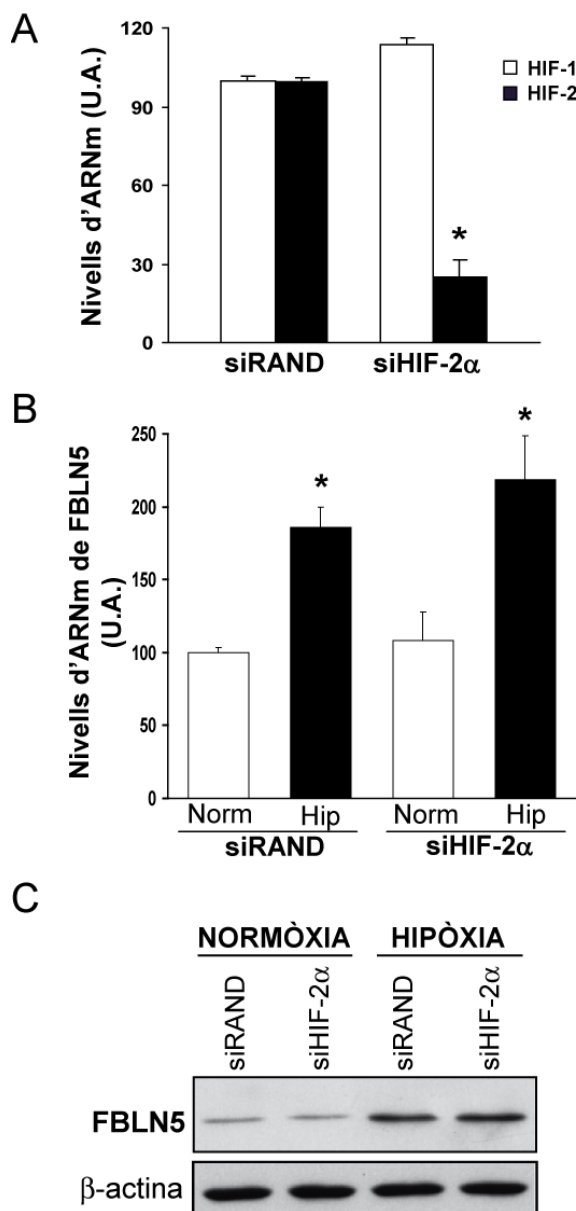


Figura 49. La inhibició de HIF-2α no altera la inducció de la FBLN5 per hipòxia.

(A) Es transfectaren HUVEC amb un siRNA específic contra HIF-2α (siHIF-2α) o amb un siRNA control (siRAND), i se'n determinaren els nivells d'ARNm de HIF-1α i HIF-2α per PCR en temps real. Els resultats s'expressen com a mitjana ± SEM (n=6; *, p<0,05: vs. cèl·lules transfectades amb siRAND). La inhibició de HIF-2α no va afectar la inducció per hipòxia dels nivells d'ARNm **(B)** i proteics **(C)** de la FBLN5 (Norm, normòxia; Hip, hipòxia). Els resultats s'expressen com a mitjana ± SEM (n=6; *, p<0,05: vs. cèl·lules en normòxia).

4.4. La hipòxia incrementa l'activitat transcripcional de FBLN5 a través d'un element de resposta a hipòxia (HRE).

Els resultats descrits fins ara suggereixen que, en condicions d'hipòxia, HIF-1 α pot incrementar l'activitat transcripcional de FBLN5. Per tal d'examinar aquesta hipòtesi, es van clonar 1650 pb del promotor de la FBLN5 en el vector reporter per a la luciferasa pGL3, i la construcció resultant (pGL3/pFBLN5-1650) es va utilitzar en estudis de transfecció transitòria en BAEC. Tal i com mostra la Fig.50 A, la hipòxia indueix l'activitat transcripcional de *FBLN5* unes 2 vegades. De manera similar, la co-transfecció amb un vector d'expressió de HIF-1 α (pHIF-1 α) va incrementar l'activitat del promotor de FBLN5, en comparació amb cèl·lules co-transfectades amb el vector d'expressió buit (Fig. 50 B).

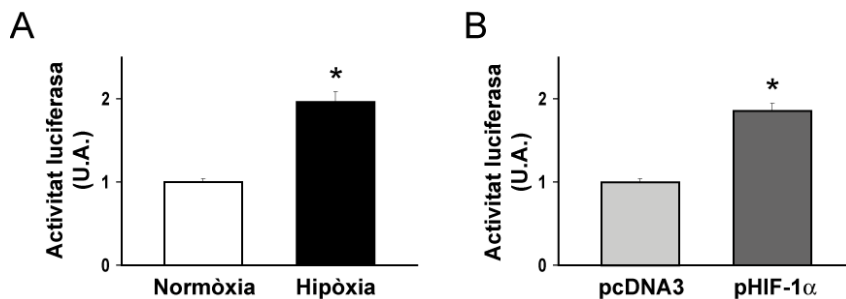


Figura 50. La hipòxia indueix l'activitat transcripcional del promotor de FBLN5. (A) Es transfectaren BAEC amb la construcció pGL3/pFBLN5-1650 i s'incubaren en condicions de normòxia o hipòxia durant 18 h. (B) Alternativament, aquestes cèl·lules es co-transfectaren amb un vector d'expressió de HIF-1 α (pHIF-1 α) o el seu corresponent vector buit (pcDNA3); i es mantingueren en normòxia. Es determinà l'activitat luciferasa i β -galactosidasa d'ambdós experiments tal i com es descriu a la secció de *Material i Mètodes*. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm SEM (n=9; *, p<0,05: vs. cèl·lules en normòxia o vs. cèl·lules co-transfectades amb pcDNA3).

L'estudi de deleccions seriadades del promotor de FBLN5 va determinar que la regió proximal de 329 pb manté la capacitat d'activar-se tant per hipòxia com per sobre-expressió de HIF-1 α (Fig. 51). No vam poder acotar més la regió sensible a hipòxia perquè la delecció de les seqüències més proximals del promotor de FBLN5 comporta la pèrdua de l'activitat transcripcional, tal i com s'havia descrit prèviament [440]. Mitjançant anàlisis *in silico* amb el programa *MatInspector*, vam identificar un possible HRE en la posició -78. Per tal d'avaluar-ne la funcionalitat, vam realitzar estudis de mutagènesi dirigida. Tal i com es mostra a la Fig. 51, la mutació de la seqüència de l'HRE va anul·lar completament l'activació del promotor

RESULTATS

de FBLN5 promoguda tant per la hipòxia com per la sobre-expressió de HIF-1 α . Aquests resultats suggereixen que l'element HRE estudiat confereix al promotor de FBLN5 la capacitat d'induir-se per hipòxia.

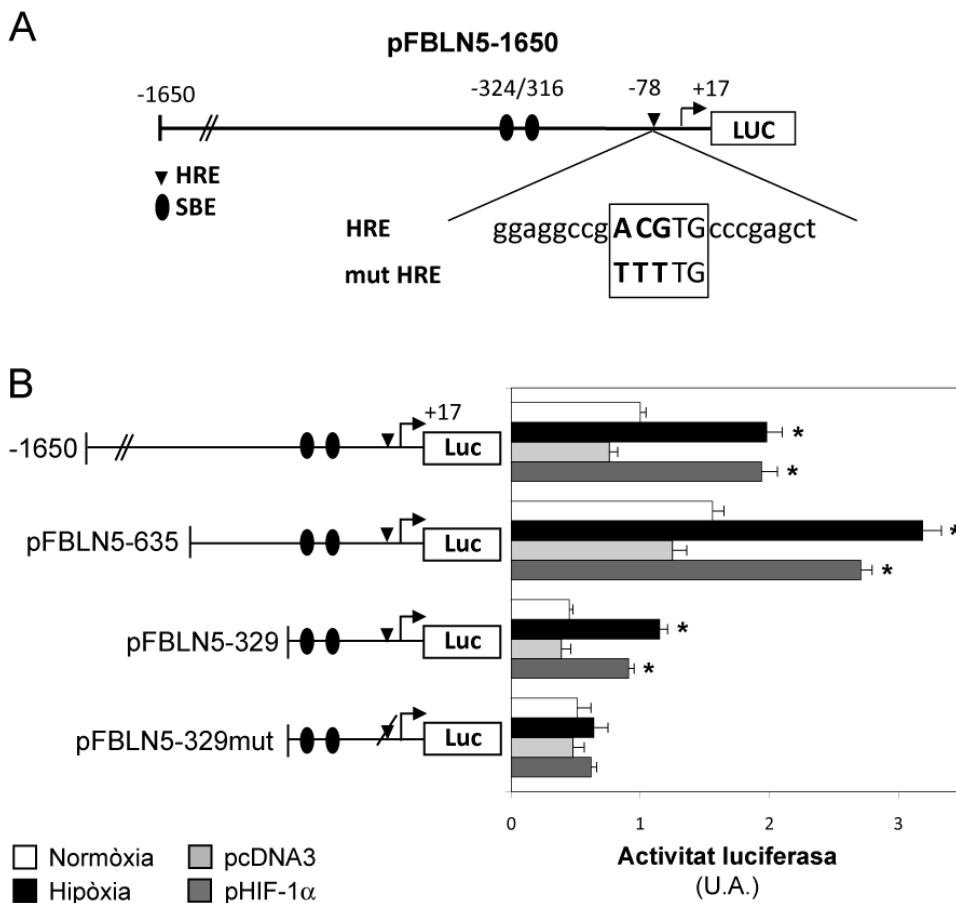


Figura 51. La hipòxia activa el promotor de FBLN5 a través d'un HRE situat en posició -78. (A) Esquema corresponent a la regió del promotor de FBLN5 analitzada en els estudis de transfecció transitòria. S'hi mostra la localització de dos elements d'unió a Smad (SBE), així com la seqüència de l'HRE putatiu. Els canvis introduïts per mutagènesi s'indiquen en negreta. **(B)** El promotor de FBLN5 s'analitzà per delecions seriades amb les construccions reporteres per a la luciferasa pGL3/pFBLN5-1650 (-1650), pFBLN5-635 i pFBLN5-329. El triangle indica la posició de l'HRE, i el triangle tatxat, l'element mutagenitzat. S'incubaren BAEC en condicions de normòxia o hipòxia durant 18 h, o es co-transfectaren amb el vector d'expressió de HIF-1 α (pHIF-1 α) o el corresponent vector buit (pcDNA3). Els valors d'activitat luciferasa s'indiquen com a unitats arbitràries referides als valors de pFBLN5-1650 en normòxia. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm SEM (n=9; *, p<0,05: vs. cèl·lules en normòxia o vs. cèl·lules co-transfectades amb pcDNA3).

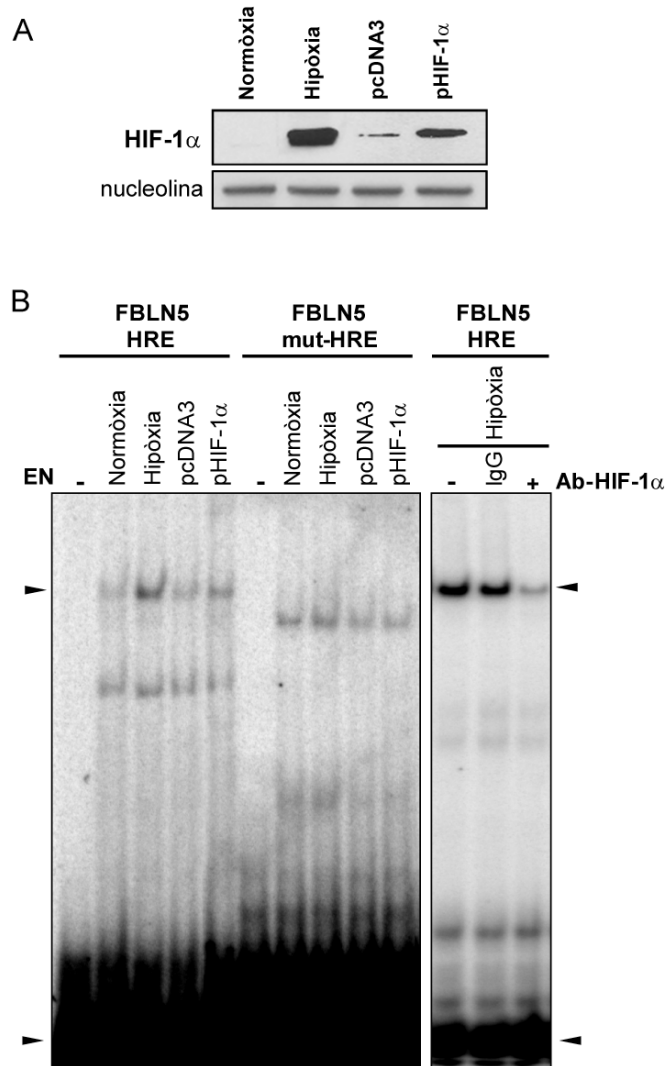


Figura 52. La hipòxia promou la unió de HIF-1 a l'HRE del promotor de FBLN5. Es mantingueren cèl·lules HeLa en condicions de normòxia o hipòxia, o bé es transfectaren amb el vector d'expressió de HIF-1 α (pHIF-1 α) o el corresponent vector buit (pcDNA3), i se n'obtingueren extractes nuclears. **(A)** Es determinaren els nivells nuclears de HIF-1 α per *Western blot* i s'analitzaren els nivells de nucleolina com a control de càrrega. **(B)** La unió de HIF-1 α a l'ADN s'avaluà mitjançant estudis EMSA, usant una sonda corresponent a l'HRE putatiu en el promotor de FBLN5 (FBLN5-HRE). El patró de bandes obtingut s'alterà en mutagenitzar l'HRE (FBLN5mut-HRE). L'addició d'un anticòs específic contra HIF-1 α (Ab-HIF-1 α) va reduir significativament la intensitat de la banda retardada. Com a control s'utilitzà una IgG inespecífica. Les fletxes indiquen la posició de les bandes retardades específiques i l'excés de sonda lliure. Es mostra un autoradiograma representatiu de dos experiments independents. EN: extractes nuclears.

RESULTATS

4.5. HIF-1 α s'uneix al motiu HRE present en el promotor de FBLN5

Per tal de determinar la funcionalitat del HRE identificat en els estudis de transfecció transitòria, es realitzaren assajos de retard de la mobilitat electroforètica (EMSA) en cèl·lules sotmeses a hipòxia o bé transfectades amb un vector d'expressió de HIF-1 α (pHIF-1 α). Aquests estudis es realitzaren en cèl·lules HeLa, ja que presenten una eficiència de transfecció superior a la de les HUVEC. Ambdues estratègies incrementaren els nivells proteics de HIF-1 α avaluats en extractes nuclears (Fig. 52 A).

Els extractes nuclears s'incubaren amb sondes marcades radioactivament corresponents a l'HRE natiu (FBLN5-HRE) o a la seva forma mutagenitzada (FBLN5mut-HRE). Els estudis d'EMSA amb la sonda nativa donen lloc a un patró de dues bandes retardades (Fig. 52 B). Tant la hipòxia com la sobre-expressió de HIF-1 α incrementen la intensitat de la banda superior. De fet, les variacions d'intensitat de les bandes superiors corresponents a les cèl·lules exposades a hipòxia o a les transfectades amb pHIF-1 α es correlacionen amb els nivells de HIF-1 α detectats en aquestes cèl·lules per *Western blot* (Fig. 52). La mutació de l'element putatiu HRE va canviar el patró de bandes observat anteriorment i va fer desaparèixer la regulació causada tant per la hipòxia com per la sobre-expressió de HIF-1 α . Finalment, la pre-incubació d'extractes nuclears de cèl·lules incubades amb hipòxia amb un anticòs específic contra HIF-1 α va reduir significativament la intensitat de la banda superior, confirmant la participació de HIF-1 α en els complexos ADN-proteïna analitzats. Aquests resultats indiquen que la hipòxia promou la unió de HIF-1 a la seqüència HRE present en el promotor de FBLN5.

4.6. HIF-1 α s'uneix al promotor de FBLN5

Per tal de confirmar que la hipòxia promou la unió de HIF-1 al promotor de FBLN5, es realitzaren assajos d'immunoprecipitació de cromatina (ChIP) en HUVEC mantingudes en condicions de normòxia o d'hipòxia. La cromatina es féu immunoprecipitar amb un anticòs específic per a HIF-1 α . L'enriquiment en seqüències reconegudes per HIF s'analitzà per PCR amb un parell d'oligonucleòtids que flanquegen l'HRE del promotor de FBLN5 (-245/+59). De manera consistent amb els estudis d'EMSA, els resultats obtinguts amb l'anàlisi per ChIP indiquen que la hipòxia indueix el reclutament de HIF-1 α a la regió proximal del promotor de FBLN5 (Fig. 53). L'absència de senyal en les mostres immunoprecipitades amb una IgG

inespecífica confirmà l'especificitat de la tècnica. L'anàlisi d'una fracció de cromatina no immunoprecipitada (*input*), demostra que la quantitat d'ADN inicial va ser equivalent entre mostres (Fig. 53 B). Com a control positiu de la tècnica, es confirmà l'augment en el reclutament de HIF-1 α al promotor de VEGF mitjançant l'ús d'oligonucleòtids específics (Fig. 53 B). En conjunt, aquests resultats posen de manifest que la seqüència identificada en posició -78 del promotor de FBLN5 funciona com un HRE, i atorga a aquest promotor la capacitat de regular-se per hipòxia.

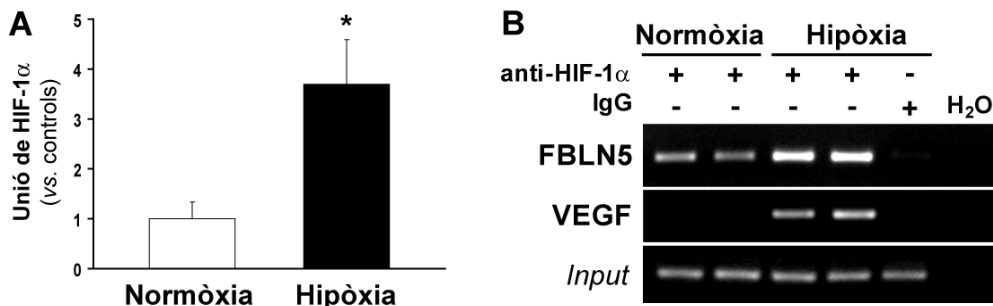


Figura 53. HIF-1 α s'uneix al promotor de FBLN5 en cèl·lules hipòxiques. S'analitzà l'associació de HIF-1 α amb el promotor de FBLN5 *in vivo* mitjançant assajos de ChIP en HUVEC mantingudes en normòxia o hipòxia durant 24 h. La cromatina es va fragmentar per sonicació i es va immunoprecipitar amb un anticòs contra HIF-1 α o amb una IgG inespecífica de cabra. L'enriquiment en seqüències reconegudes per HIF-1 es va quantificar per PCR en temps real mitjançant oligonucleòtids específics per al promotor de FBLN5. També es realitzaren reaccions de PCR a partir d'una mostra d'ADN prèvia a la immunoprecipitació (*input*), així com un control negatiu amb H₂O. **(A)** Es mostren els resultats de l'anàlisi per PCR en temps real corresponent a l'amplificació del promotor de FBLN5. Les dades es normalitzaren respecte als valors obtinguts de l'*input*. Els resultats s'expressen com la mitjana \pm SEM de dos experiments independents realitzats per duplicat (*, $p < 0,05$; vs. cèl·lules control). **(B)** Es mostra l'electroforesi en gel d'agarosa dels productes amplificats. Com a control positiu, es va amplificar per PCR convencional la regió flanquejant a l'HRE del promotor del VEGF.

RESULTATS

4.7. La inhibició de la FBLN5 potencia l'apoptosi induïda per hipòxia en CE

Un cop establerta la inducció del promotor de FBLN5 per hipòxia, vam voler analitzar si aquesta regulació podria estar involucrada en la resposta de supervivència de les CE a la hipòxia. Amb aquest objectiu, es transfectaren HUVEC amb un siRNA dirigit contra la FBLN5 (siFBLN5) o amb un siRNA control (siRAND) i es mantingueren en condicions de normòxia o hipòxia. El siFBLN5 va inhibir eficientment l'expressió de FBLN5, tal i com es va confirmar per *Western blot* (Fig. 54 A), immunofluorescència (Fig. 54 C) i PCR en temps real (Fig. 54 B). El silenciament de FBLN5 va ser específic i no va afectar l'expressió de FBLN2 o FBLN3 (Fig. 54 B).

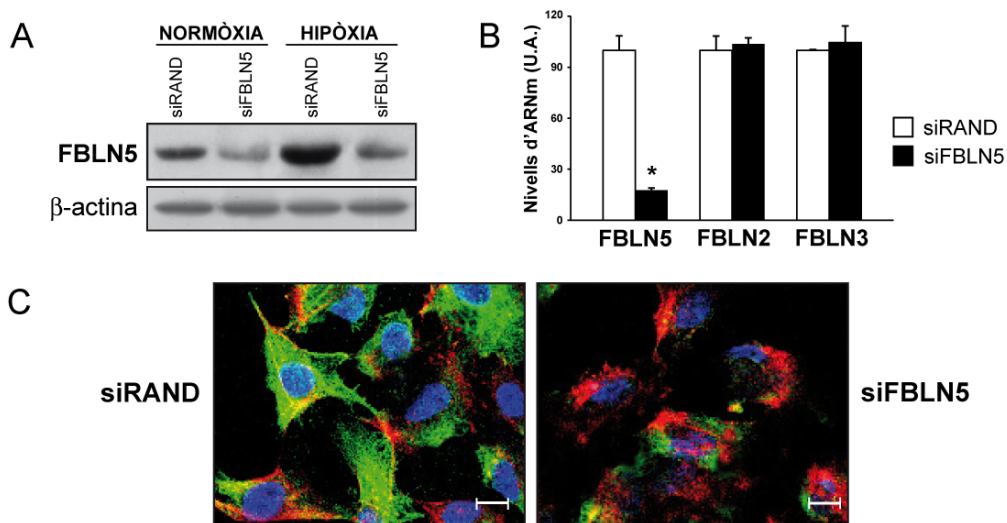


Figura 54. El *siFBLN5* inhibeix específicament l'expressió de FBLN5. Es transfectaren HUVEC amb un *siRNA* específic contra la FBLN5 (*siFBLN5*) o un *siRNA* control (*siRAND*) i es mantingueren en condicions de normòxia o hipòxia durant 24 h. **(A)** L'anàlisi per *Western blot* mostra l'eficiència de la inhibició de la FBLN5 tant en les cèl·lules normòxiques com en les hipòxiques. **(B)** S'analitzaren per PCR en temps real els nivells d'ARNm de FBLN2, 3 i 5 en HUVEC transfectades amb *siRAND* o *siFBLN5* (n=9; *, p<0,05: vs. cèl·lules transfectades amb *siRAND*). **(C)** Imatges representatives de microscòpia confocal mostrant la tinció per la FBLN5 (en verd) en HUVEC transfectades amb *siRAND* o *siFBLN5* i exposades a hipòxia. Els nuclis es marcaren amb Hoechst (blau); la F-actina es visualitza en vermell. Barres, 10 μ m.

Les cèl·lules normòxiques i hipòxiques es marcaren amb annexina V-FITC i iodur de propidi (PI) per tal d'identificar-ne les cèl·lules apoptòtiques (annexina V +, PI -). Tal i com havíem descrit en estudis previs [424], les HUVEC exposades a hipòxia mostren una taxa apoptòtica superior a les mantingudes en normòxia. L'anàlisi per FACS mostrà que el bloqueig de l'expressió de FBLN5 en condicions d'hipòxia augmenta el percentatge de cèl·lules apoptòtiques (un $19,33 \pm 0,86\%$ en cèl·lules transfectades amb siRAND vs. un $34,63 \pm 5,68\%$ en cèl·lules transfectades amb siFBLN5). També s'observà que el silenciament de FBLN5 incrementa l'apoptosi en les cèl·lules normòxiques (Fig. 56).

La reducció de la supervivència cel·lular observada en inhibir la FBLN5 es va associar a una disminució dels nivells basals de proteïna Akt total i fosforilada, així com a una menor activació d'Akt en hipòxia. En canvi, l'activació d'ERK1/2 no es va veure alterada pel bloqueig de la FBLN5 (Fig. 55). En conjunt, aquests resultats suggereixen que la inducció de l'expressió de la FBLN5 en hipòxia podria contribuir a preservar la supervivència de les CE.

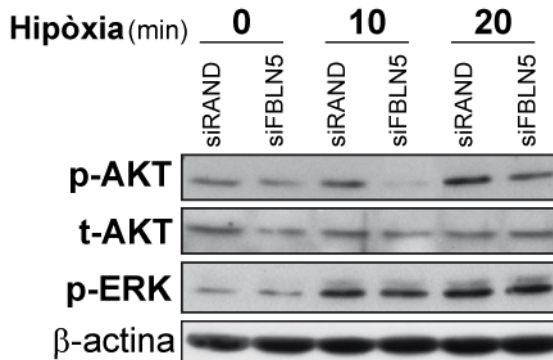


Figura 55. La inhibició de la FBLN5 disminueix l'activació d'Akt en hipòxia. Es transfectaren HUVEC amb un siRNA específic contra la FBLN5 (siFBLN5) o un siRNA control (siRAND) i, passades 48 h, s'exposaren a hipòxia durant els temps indicats. L'efecte de la inhibició la FBLN5 sobre els nivells d'Akt total (t-Akt) i sobre l'activació d'Akt (p-Akt) i d'ERK1/2 (p-ERK1/2) per hipòxia s'avaluà per *Western blot*.

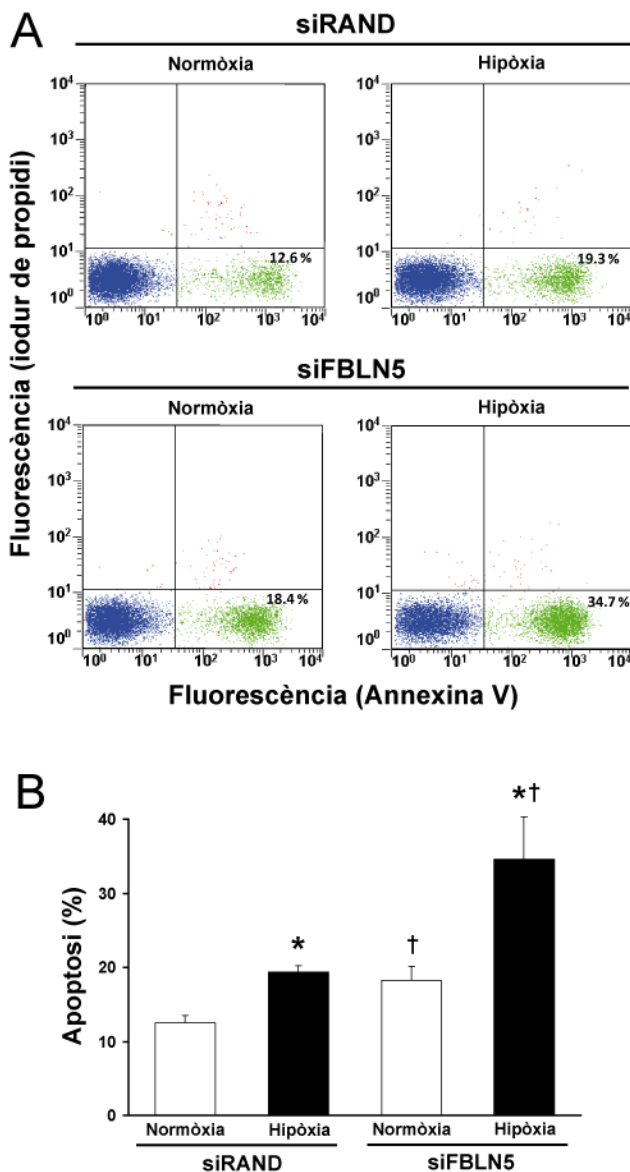


Figura 56. La inhibició de la FBLN5 potencia l'apoptosi en condicions d'hipòxia. Es transfectaren HUVEC amb un siRNA específic contra la FBLN5 (siFBLN5) o un siRNA control (siRAND) i es mantingueren en condicions de normòxia o hipòxia durant 24 h. L'apoptosi (annexina V⁺, PI⁻) s'avaluà pel marcatge d'annexina V/iodur de propidi analitzat per FACS. **(A)** Es mostren els resultats d'un experiment representatiu analitzat per FACS. **(B)** La gràfica mostra els percentatges de cèl·lules apoptòtiques en cada condició experimental. Els resultats s'expressen com a mitjana ± SEM (n=9; p<0,05: *, vs. cèl·lules transfectades amb el mateix siRNA i mantingudes en normòxia; †, vs. cèl·lules transfectades amb siRAND i mantingudes en la mateixa condició experimental).

RESULTATS

RESULTATS

DISCUSSIÓ

1. Estudi de la regulació de la LOX per hipòxia i dels mecanismes implicats

La LOX és un enzim essencial per a la funcionalitat dels teixits connectius, gràcies a la seva participació en la maduració i manteniment de la MEC [198]. A més a més del seu paper estructural, aquest enzim està involucrat en diversos processos biològics, com la regulació de l'expressió gènica i la migració cel·lular, l'adhesió o la transformació maligna [197, 198]. En els darrers anys ha crescut molt l'interès pel paper de la LOX i de les LOXL a nivell patològic [219, 280, 300, 338, 430]. De fet, l'alteració de l'expressió i l'activitat de la LOX s'ha relacionat amb processos fibròtics [223, 272], progressió tumoral i metastasi [219], i malalties CDV [110, 199, 240, 255, 441].

L'anàlisi per immunocitoquímica en artèries coronàries humanes i aortes porcines ens ha permès constatar que la LOX s'expressa fortament a l'endoteli vascular i l'adventícia. De fet, estudis previs del nostre grup impliquen la LOX en la regulació de la funció endotelial i de l'homeòstasi vascular. En concret, demostren que la LOX s'inhibeix per factors de risc ateroescleròtic (com la hipercolesterolèmia i la hiperhomocisteïnèmia) i per citocines pro-inflamatòries que promouen disfunció endotelial, i que la inhibició de la LOX s'associa amb un increment de la permeabilitat endotelial. Cal destacar que les estatines, fàrmacs que milloren la funció endotelial, normalitzen l'expressió endotelial de LOX tant *in vitro* com *in vivo* [214, 255, 257, 259, 313]. En concordança amb les nostres observacions, els ratolins deficientes per a la LOX mostren una pèrdua d'adhesió de les CE a la làmina basal, diverses anormalitats vasculares i una alteració en la morfologia de les CE, fets que evidencien que aquest enzim és essencial per al correcte desenvolupament del sistema CDV i per al manteniment de la funció endotelial [199, 200].

Els nostres resultats mostren un patró d'expressió diferencial de les diverses isoformes de la família LOX en paret arterial sana, així com en cèl·lules vasculares endotelials i musculars. Aquests enzims també mostren diferències en el seu patró d'expressió tissular [192], fet que suggereix que cadascun d'ells deu desenvolupar una funció específica. Les característiques dels ratolins deficientes per a la LOXL1, l'isoforma que presenta una estructura més propera a la LOX, reforcen aquesta hipòtesi, ja que mostren alteracions fenotípiques diferents a les observades en els animals deficientes per a la LOX i, al contrari d'aquests darrers, són viables [199, 359]. Els nostres resultats indiquen una important expressió de LOX en cèl·lules vasculares, significativament major a la de LOXL1, fet que recolza el paper clau de la

DISCUSSIÓ

LOX en la funció vascular, i que podria explicar els greus defectes vasculars en els animals deficientes per la LOX. D'altra banda, la LOXL1 sembla tenir preferència per l'elastina com a substrat, mentre que la LOX pot utilitzar indiferentment tant l'elastina com el col·lagen [268]. La LOX i la LOXL1 són els isoenzims clàssicament més vinculats al manteniment estructural de la MEC. Sorprenentment, però, l'anàlisi per PCR en temps real en artèries coronàries humanes revela una expressió de LOXL2 força similar a la de la LOX, tot i ser un isoenzim sobre el que existeix una informació limitada respecte al seu paper en el sistema vascular. Pel que fa a les isoformes LOXL3 i 4, la seva expressió a la paret vascular és negligible.

Les CMLV són elements clau en la progressió de l'aterosclerosi: són el principal component cel·lular de la neoïntima en les plaques ateroscleròtiques, i són responsables de la síntesi d'un ampli ventall de components de la MEC. S'estima que la LOX és responsable del 80% de l'activitat lisil oxidasa en CML d'aorta [268], de manera que se la considera la principal isoforma implicada en la deposició de MEC a nivell vascular. En concordança, els nostres resultats mostren que la LOX és una de les isoformes més expressades en aquestes cèl·lules. Sorprenentment i de forma similar als resultats obtinguts en artèries coronàries humanes, l'expressió de LOXL2 en CMLV també és equiparable a la de la LOX, i en HUVEC és fins i tot més elevada. La LOXL2 presenta activitat amino-oxidasa envers el col·lagen i l'elastina *in vitro*, tot i que existeix certa controvèrsia, ja que alguns autors afirmen que la seva activitat catalítica no es pot inhibir per BAPN [442]. Com ja hem indicat, la funció vascular de la LOXL2 no és clara, tot i que recentment se l'ha implicat en el control de l'angiogènesi [443], però vista la seva elevada expressió en cèl·lules vasculars, caldrà clarificar el paper d'aquest isoenzim a la paret vascular.

Com ja hem comentat, l'alteració de l'activitat LOX s'ha associat a processos patològics de diferent caire; alguns dels quals, com les malalties CDV o la progressió tumoral, tenen com a comú denominador l'aparició de zones hipòxiques [257, 282, 429]. L'estímul hipòxic promou el remodelat vascular i l'adquisició d'un fenotip metastàtic, segons el cas [33, 444-446]. El principal regulador de les respostes hipòxiques és HIF-1 [142, 447], tot i que aquest factor de transcripció també es pot activar per hormones i factors de creixement, independentment dels nivells d'oxigen, contribuint així al control de la funció vascular [448, 449]. HIF-1 regula múltiples respostes, entre elles l'expressió de proteïnes de MEC en CE [450]. A més a més, HIF-1 controla la transició d'epiteli a mesènquima i la fibrinogènesi [303], com a mínim en part, a través de la regulació de LOX i LOXL2, ambdues identificades com a gens de resposta a hipòxia en cèl·lules tumorals [217, 219].

Els resultats presentats en aquest treball indiquen que la hipòxia incrementa els nivells d'ARNm de LOX en CE, tal i com s'havia suggerit prèviament en estudis d'anàlisi d'expressió a gran escala (*microarrays*) [450]. Cal tenir en compte que l'increment de l'expressió de LOX induït per la hipòxia en CE (3 vegades) és molt inferior al descrit en cèl·lules canceroses (120 vegades) o en la línia cel·lular Hep3B (13 vegades) [217, 302], fet que suggereix que la hipòxia regula l'expressió de la LOX de manera diferent en funció del tipus cel·lular. Això és el que es dedueix de les diferències en el grau d'inducció de LOX entre teixits vascularitzats observades en els estudis d'hipòxia sistèmica. En aquest model *in vivo*, la hipòxia indueix significativament l'expressió de LOX i LOXL2 al pulmó. En canvi, aquestes isoformes s'incrementen tan sols lleugerament al cervell, un teixit en el que la hipòxia indueix fortament l'expressió de la EPO (confirmant-hi la hipòxia tissular). De fet, s'ha descrit que la hipòxia respiratòria indueix la LOX en el teixit adipós blanc, mentre que la seva expressió decreix en altres teixits com el múscul [451].

L'increment en els nivells d'ARNm de LOX en CE es va correspondre amb un increment dels nivells proteics (analitzat per immunocitoquímica) i també de l'activitat lisil oxidasa (avaluat en els sobrenedants de les CE en cultiu). En estudis previs, Postovit *et al.* [302] van detectar un fort increment dels nivells de proteïna LOX madura en cèl·lules tumorals sotmeses a hipòxia, però la seva aproximació metodològica només va detectar canvis significatius en l'activitat lisil oxidasa després de re-oxigenar les cèl·lules, ja que aquesta activitat requereix oxigen molecular. Els resultats presentats en aquest treball mostren que la inducció de l'expressió de la LOX per la hipòxia es produeix per un mecanisme transcripcional, independent de factors de secreció autocrins com el VEGF. Com ja hem indicat, la resposta de les cèl·lules a la hipòxia està dirigida per un conjunt de factors de transcripció [424, 452, 453], però principalment per HIF-1 [142, 447]. S'ha suggerit que, a més de HIF-1, altres factors de transcripció podrien participar en la inducció de la transcripció de la LOX per hipòxia [302]. En concordança, la DMOG indueix l'expressió de la LOX en menor grau a com ho fa la hipòxia mateixa, tot i causar un major increment de HIF que la hipòxia. Aquests resultats són similars als descrits per Postovit *et al.* [302] en utilitzar agents mimètics de la hipòxia. És més, ni el bloqueig de HIF-1 α mitjançant siRNA, ni la inhibició de l'eix mTOR en CE, van bloquejar eficientment la inducció de la LOX per hipòxia. En aquest sentit, estudis recents indiquen que en nombroses cèl·lules tumorals, la senyalització per Notch promou un increment en el reclutament de HIF-1 α al promotor de la LOX, augmentant així la inducció de LOX en condicions d'hipòxia [304]. Una ineficient interacció entre Notch i HIF-1 α podria explicar la menor inducció de LOX en CE. No

DISCUSSIÓ

obstant, els nostres resultats indiquen la participació d'altres mecanismes transcripcionals. Mitjançant estudis de mutagènesi dirigida, hem mostrat que l'HRE prèviament implicat en la inducció de la LOX per hipòxia en cèl·lules tumorals (HRE/-75) només és responsable d'una part de l'efecte observat en CE. A més a més, gràcies als estudis de deleccions seriades del promotor de LOX, vam acotar una zona que manté la capacitat de respondre a la hipòxia entre les posicions -821 i -405, regió que no conté l'HRE prèviament identificat. En aquest context, vam centrar la nostra atenció en altres factors de transcripció, principalment en la senyalització per Smad, ja que en CE aquesta via participa en les respostes cel·lulars a la hipòxia. Les proteïnes Smad s'activen per hipòxia en diversos tipus cel·lulars, incloent-hi les HUVEC [188, 426, 454]. La cooperació entre els Smad i HIF-1 α està àmpliament documentada [182, 183]. Els Smad també interaccionen amb altres factors de transcripció, com les proteïnes FoxO, regulant les respostes de les CE a la hipòxia [455]. En aquest sentit, hem observat que la sobre-expressió de les proteïnes Smad 2 i 3, juntament amb Smad 4, promou una major inducció de l'activitat transcripcional del promotor de LOX en les cèl·lules exposades a la hipòxia, mentre que l'activitat basal d'aquest promotor en condicions de normòxia no es va modificar amb aquesta estratègia. Aquest comportament és similar al descrit per al TGF- β 2, que també s'indueix per hipòxia en HUVEC de manera dependent de Smad [426]. No es coneixen amb claredat els mecanismes a través dels quals les proteïnes Smad participen en la regulació per hipòxia en CE. En el cas del TGF- β 2, s'ha suggerit la implicació d'un procés autocrí en el que la bio-activació del TGF- β 2 per hipòxia promouria la inducció de l'eix ~~Smad~~ Smad [426]. No obstant, tal i com hem indicat, els nostres resultats descarten la implicació de factors autocrins en la regulació de LOX. Per tant, tenint en compte que la hipòxia activa múltiples cinases intracel·lulars capaces de promoure l'activació dels Smad per fosforilació, es podria especular amb la implicació d'un mecanisme independent de TGF β R.

La senyalització per ROS controla molts aspectes de la fisiopatologia de la paret vascular. Les ROS alteren la funció vascular i contribueixen al remodelat vascular i a la reorganització de la MEC associada a malalties CDV com l'aterosclerosi o la hipertensió [456]. La inducció d'estrès oxidatiu en condicions d'hipòxia ha estat motiu de controvèrsia, no obstant, s'ha demostrat que l'exposició aguda a la hipòxia provoca un increment en la generació de ROS per part del complex III de la cadena respiratòria. De fet, les ROS generades a la mitocondria són necessàries per a l'estabilització de HIF-1 α en resposta a hipòxia, probablement per que inhibeixen les prolil hidroxilases que menen HIF-1 α a la ubiquitinització i posterior degradació

proteosòmica [175, 176, 425]. Per tant, les ROS semblen ser l'estímul inicial que vehicula les respostes dependents de HIF-1 α en condicions d'hipòxia. En aquest sentit, els nostres experiments amb inhibidors d'estrès oxidatiu evidencien la rellevància de la senyalització per ROS en la inducció de la LOX per hipòxia. Aquest resultat és en certa manera inesperat, tenint en compte que, tot i que les ROS semblen ser essencials per a la inducció de HIF-1 α , el silenciament d'aquest factor només va contrarestar lleument la inducció de LOX per hipòxia. En aquest sentit, cal destacar que la NADPH oxidasa, una de les principals fonts de ROS en les CE, també pot contribuir a la generació de ROS en condicions d'hipòxia [457], i que el seu paper en la senyalització dependent d'hipòxia s'ha d'establir amb més claredat. A més a més, la senyalització per Smad també pot induir l'alliberament de ROS [458], de manera que el bloqueig de la inducció de LOX causat pels inhibidors d'estrès oxidatiu pot derivar-se de la inhibició tant de la via de senyalització de HIF-1 α com de la de les proteïnes Smad.

En resum, els nostres resultats impliquen les vies de senyalització per Smad i per ROS en la inducció de la LOX per hipòxia en CE, tot i que caldrà precisar quins són els mecanismes pels quals HIF-1, els Smad i les ROS modulen l'activitat transcripcional de LOX en CE i quines són les conseqüències funcionals d'aquesta resposta.

2. Anàlisi de la regulació de l'expressió gènica per la LOX

Tal i com comentàvem, les funcions de la LOX no es limiten al seu paper en la maduració de la MEC, sinó que tant la forma catalíticament activa de la LOX com el seu propèptid intervenen en el control de diverses activitats biològiques, entre les que en destaca la regulació de l'expressió gènica [198, 430]. Així, la LOX regula l'activitat transcripcional d'altres gens, com ara el col·lagen III i l'elastina [237, 238], un efecte probablement relacionat amb la presència de LOX al nucli i amb la seva capacitat d'utilitzar les histones H1 i H2 com a substrat [215, 236]. En aquest estudi hem volgut caracteritzar com afecta la sobre-expressió de LOX al patró d'expressió de les CE mitjançant una estratègia de *microarrays*.

Els nostres resultats mostren l'elevada eficiència del sistema lentiviral utilitzat per a la sobre-expressió en CE, el qual permet incrementar el nivell de proteïna LOX en la seva forma proteolitzada i catalíticament activa, no només a nivell intracel·lular, sinó també a l'espai extracel·lular. Cal destacar que la sobre-expressió de LOX no es

DISCUSSIÓ

compensa per la resta d'isoenzims de la família de lisil oxidases, els quals, com ja hem indicat, si bé presenten activitat amino oxidasa, probablement tinguin substrats i funcions específiques a la vasculatura [192]. L'anàlisi d'expressió a gran escala mitjançant *microarrays* en CE que sobre-expressen LOX, posa de manifest que aquest enzim controla processos de senyalització cel·lular i comunicació cèl·lula-cèl·lula, aspectes que poden repercutir notablement en la fisiopatologia vascular.

La sobre-expressió de LOX en CE comporta una disminució molt significativa de l'expressió de l'A2M, un inhibidor de proteases universal abundant en el plasma i a l'espai extracel·lular [459]. L'A2M es sintetitza eminentment al fetge, font principal de l'A2M circulant, no obstant, tant fibroblasts com astròcits, cèl·lules tumorals i macròfags, entre d'altres, poden secretar localment aquesta proteïna [460-463]. Tot i que existeix controvèrsia respecte a la seva expressió en CE, l'A2M també s'ha identificat a l'endoteli de les artèries coronàries i dels vasos sanguinis que irriguen l'endometri [464, 465], en concordança amb els resultats obtinguts en HUVEC. D'entre les metal·loproteases fortament inhibides per l'activitat A2M, cal destacar-ne la BMP-1, l'enzim que proteolitza el precursor de la LOX donant lloc a la forma catalíticament activa [466]. Per tant, la inhibició de l'A2M promouria un increment en els nivells de BMP-1 i una major activació proteolítica de la LOX, permetent així que la sobre-expressió de la LOX es correspongui amb un augment en els nivells de l'enzim catalíticament actiu. Cal tenir en compte que la BMP-1 també participa en el processament biosintètic d'un ampli rang de precursors de la MEC, incloent-hi col·làgens fibril·lars, pro-laminina-5 i pro-biglicà, a més de promoure l'alliberació d'un gran nombre de membres de la superfamília del TGF- β que es troben en forma latent (BMP-2, BMP-4 o TGF- β 1, entre d'altres) [467]. Per tant, són diversos els mecanismes a través dels quals la inhibició de l'A2M potenciaria la síntesi i deposició de MEC ja incrementada per la pròpia sobre-expressió de LOX.

A part d'interaccionar virtualment amb qualsevol proteasa de l'espai extracel·lular per promoure la seva internalització i degradació lisosomal, en els darrers anys s'ha evidenciat l'extraordinària capacitat de l'A2M per unir-se a un ampli ventall de citocines i factors de creixement, entre els que es troben el TNF- α , les interleucines-1 β , 2 i 6, el TGF- β 1 i el bFGF [459]. En gran part, el significat fisiològic d'aquestes interaccions es desconeix. S'ha proposat que davant d'una situació inflamatòria, la interacció de l'A2M amb citocines i proteases permetria la ràpida eliminació d'aquests agents del punt focal en el que s'alliberaren, limitant així les accions perjudicials d'aquests efectors. No obstant, la unió a citocines i factors de

creixement pot ser reversible i, tal i com s'ha postulat en el cas del TGF- β 1, l'A2M podria actuar com a proteïna transportadora, dirigint aquests factors a les seves zones d'acció [468]. A més a més, cal destacar el paper dual de l'A2M en la regulació de la trombogènesi i la fibrinòlisi: per una banda presenta efectes anticoagulants, a través de la inhibició de la trombina, i de l'altra, procoagulants, ja que suprimeix la formació del complex anticoagulant APC/proteïna S [469-471]. Per tant, l'A2M tindria la capacitat de modular múltiples respostes biològiques en diferents tipus cel·lulars [459], fet que fa que pugui jugar un paper fonamental en el desenvolupament de diverses patologies. Queda per establir si la inhibició de l'A2M com a conseqüència de la sobre-expressió de la LOX podria tenir efectes fisiopatològics en l'homeòstasi de l'endoteli.

4. Estudi de la regulació de la FBLN5 per hipòxia i dels mecanismes implicats

La FBLN5 és una proteïna de MEC essencial per a la correcta formació de les fibres elàstiques [340, 341, 343, 344, 474]. Dirigeix l'elastogènesi mitjançant el reclutament de components de les fibres elàstiques a la proximitat de la superfície cel·lular [341, 342, 358]. El seu paper en la síntesi de MEC fa que aquesta proteïna sigui clau en processos fisiològics com el desenvolupament, el remodelat de matriu i la cicatrització [340, 371, 373, 410, 475]. L'alteració de l'expressió de la FBLN5 s'ha relacionat amb diversos processos fisiopatològics, com el càncer [346] i el prolapse d'òrgans pèlvics [476], i mutacions en el gen de la FBLN5 s'associen amb degeneració macular i amb formes severes de cutis laxa [402, 404]. A més a més del seu paper estructural, la FBLN5 actua com una proteïna multifuncional involucrada en la senyalització cèl·lula-cèl·lula i matriu-cèl·lula, afectant processos com la proliferació, l'adhesió i la migració [341, 344, 365, 367, 374, 477], així com l'estat redox vascular [364, 412] i la síntesi de proteases de MEC [376, 398]. La FBLN5 millora la funcionalitat de les cèl·lules vasculares en promoure'n la síntesi d'agents vasoprotectors com la prostacilina [374, 477]. Per altra banda, inhibeix la migració de CMLV envers potents agents quimiotàctics com són el PDGF i el VEGF. Estudis *in vivo* amb ratolins deficientes per a la FBLN5 sotmesos a dany vascular indiquen que aquesta proteïna és necessària per a limitar la migració de CMLV a la íntima [373]. No obstant, en models animals l'expressió de la FBLN5 es troba augmentada en les lesions ateroscleròtiques avançades [340, 344]. Aquesta aparent contradicció s'explica si tenim en compte que la inducció de la FBLN5, que

DISCUSSIÓ

es produeix en estadis molt avançats de la lesió, pot ser un mecanisme de defensa que alentiria la progressió de la lesió. Per tant, la FBLN5 també juga un paper clau en la progressió de la lesió ateroscleròtica, procés durant el qual l'engruiximent de la neoïntima dóna lloc a la generació de regions d'hipòxia.

En aquest treball mostrem que la hipòxia indueix l'expressió de la FBLN5 en CE vasculars de diferents orígens (humanes, bovines o murines), així com a la línia cel·lular d'origen epitelial HeLa, fet que suggereix que estem davant d'un procés generalitzat. En les nostres aproximacions, la inducció de l'expressió de la FBLN5 per hipòxia es va traduir en un augment dels seus nivells proteics a l'espai intracel·lular i extracel·lular, tal i com se'n deriva dels estudis de *Western blot*, tant en lisats com en sobrenedants cel·lulars, i de les immunocitoquímiques de CE cultivades en condicions de normòxia o hipòxia.

La inhibició amb DMOG de les prolil hidroxilases que menen HIF-1 α a la via de degradació proteosòmica [146] també va incrementar l'expressió de la FBLN5 en CE, fet que suggereix la implicació de HIF-1 en la inducció de la FBLN5 per hipòxia. De fet, el bloqueig de HIF-1 α mitjançant un siRNA específic reforça aquesta idea, ja que va reduir de manera significativa l'increment dels nivells d'ARNm de FBLN5 provocat per la hipòxia. En aquest sentit, la sobre-expressió de HIF-1 α va augmentar l'activitat transcripcional de la FBLN5 en un grau similar al de la pròpia hipòxia. A més a més, la inhibició de l'eix PI3K/Akt/mTOR, el qual està involucrat en la regulació de HIF-1 [124] i en la inducció de la FBLN5 per el TGF- β 1 [440], va reduir significativament la inducció de la FBLN5 per hipòxia. Tots aquests resultats apunten a HIF-1 com a responsable de la inducció de l'expressió de la FBLN5. Tot i que HIF-2 també participa en la resposta adaptativa a l'estrès hipòxic, en les nostres condicions experimentals, la hipòxia va augmentar molt discretament els nivells proteics de HIF-2 α en HUVEC [439]. A més a més, el bloqueig de HIF-2 α no va afectar la inducció de la FBLN5 per hipòxia. Per tant, vam descartar la possible implicació de HIF-2 α en la regulació de la FBLN5 per hipòxia.

L'estudi de deleccions seriades del promotor de la FBLN5 ens va permetre acotar la regió proximal de 329 pb com a responsable de la inducció de l'activitat transcripcional tant per hipòxia com per la sobre-expressió de HIF-1 α . L'anàlisi *in silico* d'aquesta seqüència va evidenciar la presència d'un dels dos elements de resposta a Smad presents al promotor de FBLN5 descrits prèviament [440] i també d'un HRE putatiu localitzat a -78. Ja hem comentat, en parlar de la LOX, que les proteïnes Smad poden estar involucrades en la resposta cel·lular a la hipòxia. No

obstant, no sembla que sigui el cas, ja que la mutagènesi de la seqüència de l'HRE putatiu va fer desaparèixer completament la inducció de l'activitat transcripcional de la FBLN5 per hipòxia. La funcionalitat d'aquest element es va confirmar en assajos d'EMSA, que mostren com la hipòxia va incrementar la capacitat d'interacció d'extractes nuclears a aquesta seqüència reguladora, i que identifiquen HIF-1 α com a responsable del patró de retard observat. Els estudis de ChIP van confirmar que la unió entre HIF-1 α i la seqüència HRE situada a -78 en el promotor de la FBLN5 també es dona *in vivo*, corroborant així la funcionalitat d'aquest element. Existeixen molt pocs estudis que hagin abordat la caracterització del promotor de la FBLN5, de manera que l'HRE identificat en aquest estudi és un dels pocs elements reguladors d'aquest gen descrits fins ara. Per tant, els nostres resultats identifiquen FBLN5 com a nou gen diana de HIF-1.

La FBLN5 és capaç de regular processos de manera específica segons el teixit i el tipus cel·lular. En cèl·lules vasculares, la FBLN5 regula la proliferació i motilitat cel·lulars i l'activitat de proteases de MEC de manera diferent a com ho fa en altres cèl·lules, com els fibroblasts o les cèl·lules de fibrosarcoma [376, 398]. Es desconeix per quin mecanisme la mateixa proteïna pot causar efectes fins i tot oposats, però podria estar relacionat amb diferències en la MEC de l'entorn cel·lular o en la unió de la FBLN5 a integrines. Recordem que, tot i que la FBLN5 promou l'adhesió de CMLV mitjançant integrines, aquesta unió no va acompanyada de l'activació de la senyalització per integrines [344, 365]. De fet, s'ha proposat que la FBLN5 podria actuar com a antagonista d'integrines [365], un concepte que obre noves expectatives per a la FBLN5 com a reguladora de l'homeòstasi cel·lular.

Les nostres dades preliminars (no mostrades) suggereixen que la FBLN5 podria contribuir a la millora de l'adhesió de les CE en hipòxia, en concordança amb estudis previs [374]. De fet, la FBLN5 afavoreix l'adhesió de les CE a la MEC, fet que contribueix a preservar les característiques estructurals i funcionals de la monocapa que conforma l'endoteli [477]. A més a més, la FBLN5 coopera amb la FBLN2 en el manteniment de la integritat de la paret arterial en resposta al dany, evitant un remodelat vascular exacerbat [391].

Els nostres resultats indiquen que la inducció de l'expressió de la FBLN5 en condicions isquèmiques s'associa a la resposta de supervivència de les CE a la hipòxia. En concordança, s'ha observat que els fibroblasts que presenten una forma mutada de la FBLN5 pròpia de la cutis laxa recessiva tenen una major taxa d'apoptosi, comparat amb els fibroblasts que presenten la FBLN5 nativa [478]. De

DISCUSSIÓ

fet, els nostres resultats demostren que el bloqueig prolongat de la FBLN5 redueix els nivells de proteïna Akt total i la seva activació per fosforilació en resposta a la hipòxia. L'activació d'Akt és crítica per a la supervivència cel·lular a la hipòxia [424, 479] i, per tant, aquests resultats són coherents amb el paper de la FBLN5 en supervivència cel·lular. Els mecanismes implicats en el paper protector de la FBLN5 són complexos i encara no es coneixen amb detall. Recentment, s'ha descrit que la FBLN5 regula la producció de ROS en CE [412]. A més a més, la FBLN5 pot activar la senyalització via integrines, la qual està involucrada en supervivència cel·lular [480], tot i que, tal i com hem mencionat anteriorment, segons els casos pugui actuar com a antagonista d'integrines. L'efecte anti-apoptòtic de la FBLN5 que hem observat podria implicar mecanismes específics segons el tipus cel·lular, els quals, units a l'alteració de l'expressió d'integrines i de la composició de la MEC que es produeix en condicions d'hipòxia, compliquen encara més la comprensió dels mecanismes de senyalització entre MEC i cèl·lula [481-483].

La FBLN5 és un component de la MEC que uneix integrines i, per tant, clàssicament es considera que la seva activitat biològica depèn de la seva localització extracel·lular. Zhou *et al.* [484] han descrit recentment que la FBLN5 s'uneix i co-localitza amb la proteïna Nogo-B al citosol i a la superfície de cèl·lules HeLa, de manera que Nogo-B facilitaria la secreció de la FBLN5. No obstant, aquest treball no analitza si la FBLN5 pot afectar la funció de Nogo-B ni atribueixen cap "funció intracel·lular" a la FBLN5. De fet, no hi ha cap evidència que indiqui que la FBLN5 pugui tenir algun paper a nivell intracel·lular. No obstant, tenint en compte que encara no es comprenen amb claredat els mecanismes moleculars implicats en la biologia de la FBLN5, i que la hipòxia incrementa tant els nivells intracel·lulars com extracel·lulars de la FBLN5, no podem descartar que la FBLN5 pugui tenir un paper intracel·lular en el control de la supervivència cel·lular. En definitiva, caldrà realitzar més estudis per tal de clarificar els mecanismes pels quals la FBLN5 regula la supervivència de la CE.

CONCLUSIONS

Les conclusions d'aquests estudi per a cadascun dels objectius plantejats han estat les següents:

Respecte a l'objectiu 1:

- En artèries coronàries humanes, LOX s'expressa principalment a l'endoteli i a l'adventícia i és, juntament amb LOXL2, la principal isoforma expressada en cèl·lules vasculares.
- La hipòxia indueix l'expressió de LOX en cèl·lules endotelials de manera independent de factors autocrins a través d'un mecanisme transcripcional en el que participen proteïnes Smad i l'estrès oxidatiu, i en el que HIF-1 tindria un paper secundari.
- La hipòxia sistèmica/respiratòria indueix l'expressió de LOX i LOXL2 de manera específica segons el teixit.

Respecte a l'objectiu 2:

- La sobre-expressió de LOX en cèl·lules endotelials mitjançant un sistema lentiviral indueix canvis en la expressió gènica que afecten la senyalització i la comunicació cèl·lula-cèl·lula, d'entre els quals en destaca la inhibició de l'A2M.

Respecte a l'objectiu 4:

- La hipòxia indueix l'expressió i secreció de la FBLN5, tant en cèl·lules endotelials de diferent origen, como en cèl·lules epitelials.
- La regulació de la FBLN5 per hipòxia es produeix a través d'un mecanisme transcripcional en el que participa l'eix de senyalització PI3K/Akt/mTOR i el factor de resposta a hipòxia HIF-1 a través d'un HRE situat a la regió proximal del promotor de la FBLN5.
- La FBLN5 participa en la resposta de supervivència de les cèl·lules en front a la hipòxia.

CONCLUSIONS

BIBLIOGRAFIA

1. Lusis, A.J., *Atherosclerosis*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 233-41.
2. Badimon, L. and J. Martinez-Gonzalez, [*Endothelium and vascular protection: an update*]. Rev Esp Cardiol, 2002. **55 Suppl 1**: p. 17-26.
3. Vane, J.R., E.E. Anggard, and R.M. Botting, *Regulatory functions of the vascular endothelium*. N Engl J Med, 1990. **323**(1): p. 27-36.
4. Davignon, J. and P. Ganz, *Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis*. Circulation, 2004. **109**(23 Suppl 1): p. III27-32.
5. Rokitsansky, C.V., *A Manual of Pathological Anatomy*. 1852.
6. Marchand, F.J., *Über Arteriosklerose*. Verhandlungen des Kongress für innere medizin 21st Kongress, Leipzig, 1904.
7. Anitschkow, C., *Über experimentelle cholesterinöse und ihre Bedeutung für die Entstehung einiger pathologischer Prozesse*. Pathol anat, 1913.
8. Haust, M.D., R.H. More, and H.Z. Movat, *The role of smooth muscle cells in the fibrogenesis of arteriosclerosis*. Am J Pathol, 1960. **37**: p. 377-89.
9. Ross, R., *Atherosclerosis--an inflammatory disease*. N Engl J Med, 1999. **340**(2): p. 115-26.
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. Vanhoutte, P.M., *Endothelial dysfunction and atherosclerosis*. Eur Heart J, 1997. **18 Suppl E**: p. E19-29.
12. Gimbrone, M.A., Jr., *Vascular endothelium, hemodynamic forces, and atherogenesis*. Am J Pathol, 1999. **155**(1): p. 1-5.
13. Lundstam, U., et al., *Proteoglycans contribution to association of Lp(a) and LDL with smooth muscle cell extracellular matrix*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. **19**(5): p. 1162-7.
14. Guretzki, H.J., et al., *Atherogenic levels of low density lipoprotein alter the permeability and composition of the endothelial barrier*. Atherosclerosis, 1994. **107**(1): p. 15-24.
15. Collins, R.G., et al., *P-Selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice*. J Exp Med, 2000. **191**(1): p. 189-94.
16. Dong, Z.M., et al., *The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis*. J Clin Invest, 1998. **102**(1): p. 145-52.
17. Wittchen, E.S., *Endothelial signaling in paracellular and transcellular leukocyte transmigration*. Front Biosci, 2009. **14**: p. 2522-45.
18. Boisvert, W.A., *Modulation of atherogenesis by chemokines*. Trends Cardiovasc Med, 2004. **14**(4): p. 161-5.
19. Hamilton, J.A., et al., *MRL/lpr and MRL+/+ macrophage DNA synthesis in the absence and the presence of colony-stimulating factor-1 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*. J Immunol, 1998. **161**(12): p. 6802-11.
20. Madamanchi, N.R., A. Vendrov, and M.S. Runge, *Oxidative stress and vascular disease*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(1): p. 29-38.

BIBLIOGRAFIA

21. Picchi, A., et al., *Tumor necrosis factor-alpha induces endothelial dysfunction in the prediabetic metabolic syndrome*. *Circ Res*, 2006. **99**(1): p. 69-77.
22. Nystrom, T., A. Nygren, and A. Sjöholm, *Increased levels of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in patients with Type II diabetes mellitus after myocardial infarction are related to endothelial dysfunction*. *Clin Sci (Lond)*, 2006. **110**(6): p. 673-81.
23. Peiser, L., S. Mukhopadhyay, and S. Gordon, *Scavenger receptors in innate immunity*. *Curr Opin Immunol*, 2002. **14**(1): p. 123-8.
24. Libby, P., P.M. Ridker, and A. Maseri, *Inflammation and atherosclerosis*. *Circulation*, 2002. **105**(9): p. 1135-43.
25. Ross, R., *The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s*. *Nature*, 1993. **362**(6423): p. 801-9.
26. Clarkson, T.B., et al., *Remodeling of coronary arteries in human and nonhuman primates*. *JAMA*, 1994. **271**(4): p. 289-94.
27. Glagov, S., et al., *Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries*. *N Engl J Med*, 1987. **316**(22): p. 1371-5.
28. Glass, C.K. and J.L. Witztum, *Atherosclerosis. the road ahead*. *Cell*, 2001. **104**(4): p. 503-16.
29. Katsuda, S. and T. Kaji, *Atherosclerosis and extracellular matrix*. *J Atheroscler Thromb*, 2003. **10**(5): p. 267-74.
30. Stoneman, V.E. and M.R. Bennett, *Role of apoptosis in atherosclerosis and its therapeutic implications*. *Clin Sci (Lond)*, 2004. **107**(4): p. 343-54.
31. Sanz, J. and Z.A. Fayad, *Imaging of atherosclerotic cardiovascular disease*. *Nature*, 2008. **451**(7181): p. 953-7.
32. Bjornheden, T. and G. Bondjers, *Oxygen consumption in aortic tissue from rabbits with diet-induced atherosclerosis*. *Arteriosclerosis*, 1987. **7**(3): p. 238-47.
33. Bjornheden, T., et al., *Evidence of hypoxic areas within the arterial wall in vivo*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999. **19**(4): p. 870-6.
34. Sluimer, J.C., et al., *Hypoxia, hypoxia-inducible transcription factor, and macrophages in human atherosclerotic plaques are correlated with intraplaque angiogenesis*. *J Am Coll Cardiol*, 2008. **51**(13): p. 1258-65.
35. Fraisl, P., et al., *Regulation of angiogenesis by oxygen and metabolism*. *Dev Cell*, 2009. **16**(2): p. 167-79.
36. Virmani, R., et al., *Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. **25**(10): p. 2054-61.
37. Guzman, R.J., *Clinical, cellular, and molecular aspects of arterial calcification*. *J Vasc Surg*, 2007. **45 Suppl A**: p. A57-63.
38. Shao, J.S., J. Cai, and D.A. Towler, *Molecular mechanisms of vascular calcification: lessons learned from the aorta*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. **26**(7): p. 1423-30.

39. Lee, R.T. and P. Libby, *The unstable atheroma*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997. **17**(10): p. 1859-67.
40. Clarke, M. and M. Bennett, *The emerging role of vascular smooth muscle cell apoptosis in atherosclerosis and plaque stability*. *Am J Nephrol*, 2006. **26**(6): p. 531-5.
41. Galis, Z.S., et al., *Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques*. *J Clin Invest*, 1994. **94**(6): p. 2493-503.
42. Kolodgie, F.D., et al., *Apoptosis in atherosclerosis. Does it contribute to plaque instability?* *Cardiol Clin*, 2001. **19**(1): p. 127-39, ix.
43. Tabas, I., *Macrophage apoptosis in atherosclerosis: consequences on plaque progression and the role of endoplasmic reticulum stress*. *Antioxid Redox Signal*, 2009. **11**(9): p. 2333-9.
44. Badimon, L., et al., *Vessel wall-related risk factors in acute vascular events*. *Drugs*, 1991. **42 Suppl 5**: p. 1-9.
45. Davies, M.J., et al., *Risk of thrombosis in human atherosclerotic plaques: role of extracellular lipid, macrophage, and smooth muscle cell content*. *Br Heart J*, 1993. **69**(5): p. 377-81.
46. Brady, A.R., et al., *Abdominal aortic aneurysm expansion: risk factors and time intervals for surveillance*. *Circulation*, 2004. **110**(1): p. 16-21.
47. Best, V.A., J.F. Price, and F.G. Fowkes, *Persistent increase in the incidence of abdominal aortic aneurysm in Scotland, 1981-2000*. *Br J Surg*, 2003. **90**(12): p. 1510-5.
48. Gillum, R.F., *Epidemiology of aortic aneurysm in the United States*. *J Clin Epidemiol*, 1995. **48**(11): p. 1289-98.
49. Sakalihasan, N., R. Limet, and O.D. Defawe, *Abdominal aortic aneurysm*. *Lancet*, 2005. **365**(9470): p. 1577-89.
50. Johnston, K.W., et al., *Suggested standards for reporting on arterial aneurysms. Subcommittee on Reporting Standards for Arterial Aneurysms, Ad Hoc Committee on Reporting Standards, Society for Vascular Surgery and North American Chapter, International Society for Cardiovascular Surgery*. *J Vasc Surg*, 1991. **13**(3): p. 452-8.
51. Alcorn, H.G., et al., *Risk factors for abdominal aortic aneurysms in older adults enrolled in The Cardiovascular Health Study*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1996. **16**(8): p. 963-70.
52. Lederle, F.A., et al., *Prevalence and associations of abdominal aortic aneurysm detected through screening. Aneurysm Detection and Management (ADAM) Veterans Affairs Cooperative Study Group*. *Ann Intern Med*, 1997. **126**(6): p. 441-9.
53. Golledge, J., et al., *Abdominal aortic aneurysm: pathogenesis and implications for management*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. **26**(12): p. 2605-13.

BIBLIOGRAFIA

54. Baxter, B.T., M.C. Terrin, and R.L. Dalman, *Medical management of small abdominal aortic aneurysms*. *Circulation*, 2008. **117**(14): p. 1883-9.
55. Lederle, F.A., D.B. Nelson, and A.M. Joseph, *Smokers' relative risk for aortic aneurysm compared with other smoking-related diseases: a systematic review*. *J Vasc Surg*, 2003. **38**(2): p. 329-34.
56. Wilmink, T.B., C.R. Quick, and N.E. Day, *The association between cigarette smoking and abdominal aortic aneurysms*. *J Vasc Surg*, 1999. **30**(6): p. 1099-105.
57. Palazzuoli, A., et al., *Prevalence of risk factors, coronary and systemic atherosclerosis in abdominal aortic aneurysm: comparison with high cardiovascular risk population*. *Vasc Health Risk Manag*, 2008. **4**(4): p. 877-83.
58. Patel, M.I., et al., *Current views on the pathogenesis of abdominal aortic aneurysms*. *J Am Coll Surg*, 1995. **181**(4): p. 371-82.
59. Lindholt, J.S., et al., *Smoking, but not lipids, lipoprotein(a) and antibodies against oxidised LDL, is correlated to the expansion of abdominal aortic aneurysms*. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2001. **21**(1): p. 51-6.
60. Norman, P., et al., *C-reactive protein levels and the expansion of screen-detected abdominal aortic aneurysms in men*. *Circulation*, 2004. **110**(7): p. 862-6.
61. Nordon, I.M., et al., *Pathophysiology and epidemiology of abdominal aortic aneurysms*. *Nat Rev Cardiol*, 2011. **8**(2): p. 92-102.
62. Brown, L.C. and J.T. Powell, *Risk factors for aneurysm rupture in patients kept under ultrasound surveillance*. *UK Small Aneurysm Trial Participants*. *Ann Surg*, 1999. **230**(3): p. 289-96; discussion 296-7.
63. Cornuz, J., et al., *Risk factors for asymptomatic abdominal aortic aneurysm: systematic review and meta-analysis of population-based screening studies*. *Eur J Public Health*, 2004. **14**(4): p. 343-9.
64. Wanhainen, A., et al., *Risk factors associated with abdominal aortic aneurysm: a population-based study with historical and current data*. *J Vasc Surg*, 2005. **41**(3): p. 390-6.
65. Forsdahl, S.H., et al., *Risk factors for abdominal aortic aneurysms: a 7-year prospective study: the Tromso Study, 1994-2001*. *Circulation*, 2009. **119**(16): p. 2202-8.
66. Golledge, J., et al., *Obesity, adipokines, and abdominal aortic aneurysm: Health in Men study*. *Circulation*, 2007. **116**(20): p. 2275-9.
67. Long, A., et al., *Prevalence of abdominal aortic aneurysm and large infrarenal aorta in patients with acute coronary syndrome and proven coronary stenosis: a prospective monocenter study*. *Ann Vasc Surg*, 2010. **24**(5): p. 602-8.
68. Wong, D.R., W.C. Willett, and E.B. Rimm, *Smoking, hypertension, alcohol consumption, and risk of abdominal aortic aneurysm in men*. *Am J Epidemiol*, 2007. **165**(7): p. 838-45.

69. Blanchard, J.F., H.K. Armenian, and P.P. Friesen, *Risk factors for abdominal aortic aneurysm: results of a case-control study*. Am J Epidemiol, 2000. **151**(6): p. 575-83.
70. Astrand, H., et al., *Reduced aortic wall stress in diabetes mellitus*. Eur J Vasc Endovasc Surg, 2007. **33**(5): p. 592-8.
71. Golledge, J., et al., *Reduced expansion rate of abdominal aortic aneurysms in patients with diabetes may be related to aberrant monocyte-matrix interactions*. Eur Heart J, 2008. **29**(5): p. 665-72.
72. Norman, P.E., et al., *Matrix biology of abdominal aortic aneurysms in diabetes: mechanisms underlying the negative association*. Connect Tissue Res, 2007. **48**(3): p. 125-31.
73. Salo, J.A., et al., *Familial occurrence of abdominal aortic aneurysm*. Ann Intern Med, 1999. **130**(8): p. 637-42.
74. Wilmink, A.B., et al., *The association between connective tissue laxity and the risk of an abdominal aortic aneurysm*. Eur J Vasc Endovasc Surg, 2000. **20**(3): p. 290-5.
75. Wahlgren, C.M., et al., *Genetic and environmental contributions to abdominal aortic aneurysm development in a twin population*. J Vasc Surg, 2010. **51**(1): p. 3-7; discussion 7.
76. Norman, P.E. and J.T. Powell, *Site specificity of aneurysmal disease*. Circulation, 2010. **121**(4): p. 560-8.
77. Ward, A.S., *Aortic aneurysmal disease. A generalized dilating diathesis*. Arch Surg, 1992. **127**(8): p. 990-1.
78. Nordon, I., et al., *Evidence from cross-sectional imaging indicates abdominal but not thoracic aortic aneurysms are local manifestations of a systemic dilating diathesis*. J Vasc Surg, 2009. **50**(1): p. 171-6 e1.
79. Davies, M.J., *Aortic aneurysm formation: lessons from human studies and experimental models*. Circulation, 1998. **98**(3): p. 193-5.
80. Zatina, M.A., et al., *Role of medial lamellar architecture in the pathogenesis of aortic aneurysms*. J Vasc Surg, 1984. **1**(3): p. 442-8.
81. McDonald, D.A., *Regional pulse-wave velocity in the arterial tree*. J Appl Physiol, 1968. **24**(1): p. 73-8.
82. Wolinsky, H. and S. Glagov, *Nature of species differences in the medial distribution of aortic vasa vasorum in mammals*. Circ Res, 1967. **20**(4): p. 409-21.
83. Dobrin, P.B., W.H. Baker, and W.C. Gley, *Elastolytic and collagenolytic studies of arteries. Implications for the mechanical properties of aneurysms*. Arch Surg, 1984. **119**(4): p. 405-9.
84. Allaire, E., et al., *Prevention of aneurysm development and rupture by local overexpression of plasminogen activator inhibitor-1*. Circulation, 1998. **98**(3): p. 249-55.

BIBLIOGRAFIA

85. Louwrens, H.D., et al., *Plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor expression by normal and aneurysmal human aortic smooth muscle cells in culture*. Eur J Vasc Endovasc Surg, 1995. **10**(3): p. 289-93.
86. Reilly, J.M., G.A. Sicard, and C.L. Lucore, *Abnormal expression of plasminogen activators in aortic aneurysmal and occlusive disease*. J Vasc Surg, 1994. **19**(5): p. 865-72.
87. Wassef, M., et al., *Pathogenesis of abdominal aortic aneurysms: a multidisciplinary research program supported by the National Heart, Lung, and Blood Institute*. J Vasc Surg, 2001. **34**(4): p. 730-8.
88. Hance, K.A., et al., *Monocyte chemotactic activity in human abdominal aortic aneurysms: role of elastin degradation peptides and the 67-kD cell surface elastin receptor*. J Vasc Surg, 2002. **35**(2): p. 254-61.
89. Steinmetz, E.F., C. Buckley, and R.W. Thompson, *Prospects for the medical management of abdominal aortic aneurysms*. Vasc Endovascular Surg, 2003. **37**(3): p. 151-63.
90. Colonnello, J.S., et al., *Transient exposure to elastase induces mouse aortic wall smooth muscle cell production of MCP-1 and RANTES during development of experimental aortic aneurysm*. J Vasc Surg, 2003. **38**(1): p. 138-46.
91. Franklin, I.J., et al., *The influence of indomethacin on the metabolism and cytokine secretion of human aneurysmal aorta*. Eur J Vasc Endovasc Surg, 1999. **18**(1): p. 35-42.
92. Holmes, D.R., et al., *Prostaglandin E2 synthesis and cyclooxygenase expression in abdominal aortic aneurysms*. J Vasc Surg, 1997. **25**(5): p. 810-5.
93. Juvonen, J., et al., *Elevated circulating levels of inflammatory cytokines in patients with abdominal aortic aneurysm*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997. **17**(11): p. 2843-7.
94. McMillan, W.D. and W.H. Pearce, *Inflammation and cytokine signaling in aneurysms*. Ann Vasc Surg, 1997. **11**(5): p. 540-5.
95. Pearce, W.H., et al., *Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha release in normal and diseased human infrarenal aortas*. J Vasc Surg, 1992. **16**(5): p. 784-9.
96. Lopez-Candales, A., et al., *Decreased vascular smooth muscle cell density in medial degeneration of human abdominal aortic aneurysms*. Am J Pathol, 1997. **150**(3): p. 993-1007.
97. Satoh, K., et al., *Cyclophilin A enhances vascular oxidative stress and the development of angiotensin II-induced aortic aneurysms*. Nat Med, 2009. **15**(6): p. 649-56.
98. Ailawadi, G., J.L. Eliason, and G.R. Upchurch, Jr., *Current concepts in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysm*. J Vasc Surg, 2003. **38**(3): p. 584-8.

99. Halloran, B.G. and B.T. Baxter, *Pathogenesis of aneurysms*. Semin Vasc Surg, 1995. **8**(2): p. 85-92.
100. Minion, D.J., et al., *Elastin is increased in abdominal aortic aneurysms*. J Surg Res, 1994. **57**(4): p. 443-6.
101. Bode, M.K., et al., *Increased amount of type III pN-collagen in human abdominal aortic aneurysms: evidence for impaired type III collagen fibrillogenesis*. J Vasc Surg, 2000. **32**(6): p. 1201-7.
102. Menashi, S., et al., *Collagen in abdominal aortic aneurysm: typing, content, and degradation*. J Vasc Surg, 1987. **6**(6): p. 578-82.
103. Michel, J.B., et al., *Novel aspects of the pathogenesis of aneurysms of the abdominal aorta in humans*. Cardiovasc Res, 2011. **90**(1): p. 18-27.
104. Holmes, D.R., et al., *Medial neovascularization in abdominal aortic aneurysms: a histopathologic marker of aneurysmal degeneration with pathophysiologic implications*. J Vasc Surg, 1995. **21**(5): p. 761-71; discussion 771-2.
105. Thompson, M.M., et al., *Angiogenesis in abdominal aortic aneurysms*. Eur J Vasc Endovasc Surg, 1996. **11**(4): p. 464-9.
106. Baxter, B.T., et al., *Abdominal aortic aneurysms are associated with altered matrix proteins of the nonaneurysmal aortic segments*. J Vasc Surg, 1994. **19**(5): p. 797-802; discussion 803.
107. Wills, A., et al., *Pathogenesis of abdominal aortic aneurysms--cellular and biochemical mechanisms*. Eur J Vasc Endovasc Surg, 1996. **12**(4): p. 391-400.
108. Satta, J., et al., *Increased turnover of collagen in abdominal aortic aneurysms, demonstrated by measuring the concentration of the aminoterminal propeptide of type III procollagen in peripheral and aortal blood samples*. J Vasc Surg, 1995. **22**(2): p. 155-60.
109. MacSweeney, S.T., et al., *Mechanical properties of the aneurysmal aorta*. Br J Surg, 1992. **79**(12): p. 1281-4.
110. Huffman, M.D., et al., *Functional importance of connective tissue repair during the development of experimental abdominal aortic aneurysms*. Surgery, 2000. **128**(3): p. 429-38.
111. Cohen, J.R., et al., *Aortic collagenase activity as affected by laparotomy, cecal resection, aortic mobilization, and aortotomy in rats*. J Vasc Surg, 1984. **1**(4): p. 562-5.
112. Ballard, D.J., et al., *Surgery for small asymptomatic abdominal aortic aneurysms*. Cochrane Database Syst Rev, 2008(4): p. CD001835.
113. Choke, E., et al., *Increased angiogenesis at the site of abdominal aortic aneurysm rupture*. Ann N Y Acad Sci, 2006. **1085**: p. 315-9.
114. Defawe, O.D., et al., *Gradient of proteolytic enzymes, their inhibitors and matrix proteins expression in a ruptured abdominal aortic aneurysm*. Eur J Clin Invest, 2004. **34**(7): p. 513-4.

BIBLIOGRAFIA

115. Harter, L.P., et al., *Ultrasonic evaluation of abdominal aortic thrombus*. J Ultrasound Med, 1982. **1**(8): p. 315-8.
116. Vorp, D.A., et al., *Association of intraluminal thrombus in abdominal aortic aneurysm with local hypoxia and wall weakening*. J Vasc Surg, 2001. **34**(2): p. 291-9.
117. Choke, E., et al., *A review of biological factors implicated in abdominal aortic aneurysm rupture*. Eur J Vasc Endovasc Surg, 2005. **30**(3): p. 227-44.
118. Kazi, M., et al., *Influence of intraluminal thrombus on structural and cellular composition of abdominal aortic aneurysm wall*. J Vasc Surg, 2003. **38**(6): p. 1283-92.
119. Chen, E.Y., M. Fujinaga, and A.J. Giaccia, *Hypoxic microenvironment within an embryo induces apoptosis and is essential for proper morphological development*. Teratology, 1999. **60**(4): p. 215-25.
120. Krishnan, J., et al., *Essential role of developmentally activated hypoxia-inducible factor 1alpha for cardiac morphogenesis and function*. Circ Res, 2008. **103**(10): p. 1139-46.
121. Stone, J., et al., *Development of retinal vasculature is mediated by hypoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression by neuroglia*. J Neurosci, 1995. **15**(7 Pt 1): p. 4738-47.
122. Wikenheiser, J., et al., *Differential levels of tissue hypoxia in the developing chicken heart*. Dev Dyn, 2006. **235**(1): p. 115-23.
123. Xu, B., et al., *Partial rescue of defects in Cited2-deficient embryos by HIF-1alpha heterozygosity*. Dev Biol, 2007. **301**(1): p. 130-40.
124. Semenza, G.L., *Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1*. Physiology (Bethesda), 2009. **24**: p. 97-106.
125. Giaccia, A., B.G. Siim, and R.S. Johnson, *HIF-1 as a target for drug development*. Nat Rev Drug Discov, 2003. **2**(10): p. 803-11.
126. Bunn, H.F. and R.O. Poyton, *Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia*. Physiol Rev, 1996. **76**(3): p. 839-85.
127. Maltepe, E. and M.C. Simon, *Oxygen, genes, and development: an analysis of the role of hypoxic gene regulation during murine vascular development*. J Mol Med (Berl), 1998. **76**(6): p. 391-401.
128. Semenza, G.L., et al., *Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1*. J Biol Chem, 1994. **269**(38): p. 23757-63.
129. Semenza, G.L., *Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology*. Trends Mol Med, 2001. **7**(8): p. 345-50.
130. Mazure, N.M., et al., *HIF-1: master and commander of the hypoxic world. A pharmacological approach to its regulation by siRNAs*. Biochem Pharmacol, 2004. **68**(6): p. 971-80.
131. Semenza, G.L., et al., *Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(13): p. 5680-4.

132. Semenza, G.L. and G.L. Wang, *A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation*. Mol Cell Biol, 1992. **12**(12): p. 5447-54.
133. Wang, G.L., et al., *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**(12): p. 5510-4.
134. Ema, M., et al., *A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1 α regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(9): p. 4273-8.
135. Gu, Y.Z., et al., *Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3 α* . Gene Expr, 1998. **7**(3): p. 205-13.
136. Semenza, G.L., *Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level*. Physiology (Bethesda), 2004. **19**: p. 176-82.
137. Tian, H., S.L. McKnight, and D.W. Russell, *Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells*. Genes Dev, 1997. **11**(1): p. 72-82.
138. Makino, Y., et al., *Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression*. Nature, 2001. **414**(6863): p. 550-4.
139. Semenza, G.L., et al., *Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1*. J Biol Chem, 1996. **271**(51): p. 32529-37.
140. Wenger, R.H., D.P. Stiehl, and G. Camenisch, *Integration of oxygen signaling at the consensus HRE*. Sci STKE, 2005. **2005**(306): p. re12.
141. Schofield, C.J. and P.J. Ratcliffe, *Oxygen sensing by HIF hydroxylases*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(5): p. 343-54.
142. Semenza, G.L., *HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia*. J Appl Physiol, 2000. **88**(4): p. 1474-80.
143. Maxwell, P.H., C.W. Pugh, and P.J. Ratcliffe, *Inducible operation of the erythropoietin 3' enhancer in multiple cell lines: evidence for a widespread oxygen-sensing mechanism*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(6): p. 2423-7.
144. Wang, G.L. and G.L. Semenza, *General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(9): p. 4304-8.
145. Ivan, M., et al., *HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing*. Science, 2001. **292**(5516): p. 464-8.

BIBLIOGRAFIA

146. Jaakkola, P., et al., *Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation*. Science, 2001. **292**(5516): p. 468-72.
147. Bruick, R.K. and S.L. McKnight, *A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF*. Science, 2001. **294**(5545): p. 1337-40.
148. Epstein, A.C., et al., *C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation*. Cell, 2001. **107**(1): p. 43-54.
149. Cockman, M.E., et al., *Hypoxia inducible factor-alpha binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein*. J Biol Chem, 2000. **275**(33): p. 25733-41.
150. Maxwell, P.H., et al., *The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis*. Nature, 1999. **399**(6733): p. 271-5.
151. Huang, L.E., et al., *Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit*. J Biol Chem, 1996. **271**(50): p. 32253-9.
152. Huang, L.E., et al., *Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O2-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(14): p. 7987-92.
153. Salceda, S. and J. Caro, *Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes*. J Biol Chem, 1997. **272**(36): p. 22642-7.
154. Yu, F., et al., *HIF-1alpha binding to VHL is regulated by stimulus-sensitive proline hydroxylation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(17): p. 9630-5.
155. Mahon, P.C., K. Hirota, and G.L. Semenza, *FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity*. Genes Dev, 2001. **15**(20): p. 2675-86.
156. Myllyharju, J., *Prolyl 4-hydroxylases, the key enzymes of collagen biosynthesis*. Matrix Biol, 2003. **22**(1): p. 15-24.
157. Hirsila, M., et al., *Characterization of the human prolyl 4-hydroxylases that modify the hypoxia-inducible factor*. J Biol Chem, 2003. **278**(33): p. 30772-80.
158. Tuckerman, J.R., et al., *Determination and comparison of specific activity of the HIF-prolyl hydroxylases*. FEBS Lett, 2004. **576**(1-2): p. 145-50.
159. Ivan, M., et al., *Biochemical purification and pharmacological inhibition of a mammalian prolyl hydroxylase acting on hypoxia-inducible factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(21): p. 13459-64.
160. Katschinski, D.M., et al., *Heat induction of the unphosphorylated form of hypoxia-inducible factor-1alpha is dependent on heat shock protein-90 activity*. J Biol Chem, 2002. **277**(11): p. 9262-7.
161. Semenza, G.L., *Perspectives on oxygen sensing*. Cell, 1999. **98**(3): p. 281-4.

162. Ebert, B.L. and H.F. Bunn, *Regulation of transcription by hypoxia requires a multiprotein complex that includes hypoxia-inducible factor 1, an adjacent transcription factor, and p300/CREB binding protein*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(7): p. 4089-96.
163. Zhu, H., T. Jackson, and H.F. Bunn, *Detecting and responding to hypoxia*. Nephrol Dial Transplant, 2002. **17 Suppl 1**: p. 3-7.
164. Lando, D., et al., *Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch*. Science, 2002. **295**(5556): p. 858-61.
165. Gorlach, A., et al., *Thrombin activates the hypoxia-inducible factor-1 signaling pathway in vascular smooth muscle cells: Role of the p22(phox)-containing NADPH oxidase*. Circ Res, 2001. **89**(1): p. 47-54.
166. Hellwig-Burgel, T., et al., *Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1*. Blood, 1999. **94**(5): p. 1561-7.
167. Zhong, H., et al., *Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics*. Cancer Res, 2000. **60**(6): p. 1541-5.
168. Spinella, F., et al., *Endothelin-1 induces vascular endothelial growth factor by increasing hypoxia-inducible factor-1alpha in ovarian carcinoma cells*. J Biol Chem, 2002. **277**(31): p. 27850-5.
169. Semenza, G.L., *Targeting HIF-1 for cancer therapy*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(10): p. 721-32.
170. Zundel, W., et al., *Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression*. Genes Dev, 2000. **14**(4): p. 391-6.
171. Patten, D.A., et al., *Hypoxia-inducible factor-1 activation in nonhypoxic conditions: the essential role of mitochondrial-derived reactive oxygen species*. Mol Biol Cell, 2010. **21**(18): p. 3247-57.
172. Yoshida, K., et al., *Thrombopoietin (TPO) regulates HIF-1alpha levels through generation of mitochondrial reactive oxygen species*. Int J Hematol, 2008. **88**(1): p. 43-51.
173. 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.
174. Michiels, C., et al., *Regulation of gene expression by oxygen: NF-kappaB and HIF-1, two extremes*. Free Radic Biol Med, 2002. **33**(9): p. 1231-42.
175. Chandel, N.S., et al., *Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1alpha during hypoxia: a mechanism of O2 sensing*. J Biol Chem, 2000. **275**(33): p. 25130-8.
176. Guzy, R.D., et al., *Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing*. Cell Metab, 2005. **1**(6): p. 401-8.

BIBLIOGRAFIA

177. Hamanaka, R.B. and N.S. Chandel, *Mitochondrial reactive oxygen species regulate hypoxic signaling*. *Curr Opin Cell Biol*, 2009. **21**(6): p. 894-9.
178. Guzy, R.D. and P.T. Schumacker, *Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia*. *Exp Physiol*, 2006. **91**(5): p. 807-19.
179. Yuan, G., et al., *Ca²⁺/calmodulin kinase-dependent activation of hypoxia inducible factor 1 transcriptional activity in cells subjected to intermittent hypoxia*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(6): p. 4321-8.
180. Yuan, G., et al., *Induction of HIF-1 α expression by intermittent hypoxia: involvement of NADPH oxidase, Ca²⁺ signaling, prolyl hydroxylases, and mTOR*. *J Cell Physiol*, 2008. **217**(3): p. 674-85.
181. Salnikow, K., et al., *The regulation of hypoxic genes by calcium involves c-Jun/AP-1, which cooperates with hypoxia-inducible factor 1 in response to hypoxia*. *Mol Cell Biol*, 2002. **22**(6): p. 1734-41.
182. Sanchez-Elsner, T., et al., *Synergistic cooperation between hypoxia and transforming growth factor-beta pathways on human vascular endothelial growth factor gene expression*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(42): p. 38527-35.
183. Sanchez-Elsner, T., et al., *Endoglin expression is regulated by transcriptional cooperation between the hypoxia and transforming growth factor-beta pathways*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(46): p. 43799-808.
184. Feng, X.H., et al., *The tumor suppressor Smad4/DPC4 and transcriptional adaptor CBP/p300 are coactivators for smad3 in TGF-beta-induced transcriptional activation*. *Genes Dev*, 1998. **12**(14): p. 2153-63.
185. Pouponnot, C., L. Jayaraman, and J. Massague, *Physical and functional interaction of SMADs and p300/CBP*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(36): p. 22865-8.
186. Sanchez-Elsner, T., et al., *A cross-talk between hypoxia and TGF-beta orchestrates erythropoietin gene regulation through SP1 and Smads*. *J Mol Biol*, 2004. **336**(1): p. 9-24.
187. Tian, F., et al., *Endothelial cells are activated during hypoxia via endoglin/ALK-1/SMAD1/5 signaling in vivo and in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010. **392**(3): p. 283-8.
188. Zhang, H., et al., *Cellular response to hypoxia involves signaling via Smad proteins*. *Blood*, 2003. **101**(6): p. 2253-60.
189. Inman, G.J., *Linking Smads and transcriptional activation*. *Biochem J*, 2005. **386**(Pt 1): p. e1-e3.
190. Burch, M.L., W. Zheng, and P.J. Little, *Smad linker region phosphorylation in the regulation of extracellular matrix synthesis*. *Cell Mol Life Sci*, 2011. **68**(1): p. 97-107.
191. Siegel, R.C., S.R. Pinnell, and G.R. Martin, *Cross-linking of collagen and elastin. Properties of lysyl oxidase*. *Biochemistry*, 1970. **9**(23): p. 4486-92.
192. Molnar, J., et al., *Structural and functional diversity of lysyl oxidase and the LOX-like proteins*. *Biochim Biophys Acta*, 2003. **1647**(1-2): p. 220-4.

193. Hayashi, K., et al., *Comparative immunocytochemical localization of lysyl oxidase (LOX) and the lysyl oxidase-like (LOXL) proteins: changes in the expression of LOXL during development and growth of mouse tissues*. J Mol Histo, 2004. **35**(8-9): p. 845-55.
194. Smith-Mungo, L.I. and H.M. Kagan, *Lysyl oxidase: properties, regulation and multiple functions in biology*. Matrix Biol, 1998. **16**(7): p. 387-98.
195. Kagan, H.M., et al., *Ultrastructural immunolocalization of lysyl oxidase in vascular connective tissue*. J Cell Biol, 1986. **103**(3): p. 1121-8.
196. Baccarani-Contri, M., et al., *Localization of human placenta lysyl oxidase on human placenta, skin and aorta by immunoelectronmicroscopy*. Matrix, 1989. **9**(6): p. 428-36.
197. Lucero, H.A. and H.M. Kagan, *Lysyl oxidase: an oxidative enzyme and effector of cell function*. Cell Mol Life Sci, 2006. **63**(19-20): p. 2304-16.
198. Kagan, H.M. and W. Li, *Lysyl oxidase: properties, specificity, and biological roles inside and outside of the cell*. J Cell Biochem, 2003. **88**(4): p. 660-72.
199. Maki, J.M., et al., *Inactivation of the lysyl oxidase gene *Lox* leads to aortic aneurysms, cardiovascular dysfunction, and perinatal death in mice*. Circulation, 2002. **106**(19): p. 2503-9.
200. Hornstra, I.K., et al., *Lysyl oxidase is required for vascular and diaphragmatic development in mice*. J Biol Chem, 2003. **278**(16): p. 14387-93.
201. Trackman, P.C., et al., *Post-translational glycosylation and proteolytic processing of a lysyl oxidase precursor*. J Biol Chem, 1992. **267**(12): p. 8666-71.
202. Kosonen, T., et al., *Incorporation of copper into lysyl oxidase*. Biochem J, 1997. **327 (Pt 1)**: p. 283-9.
203. Rucker, R.B., et al., *Copper, lysyl oxidase, and extracellular matrix protein cross-linking*. Am J Clin Nutr, 1998. **67**(5 Suppl): p. 996S-1002S.
204. Wang, S.X., et al., *A crosslinked cofactor in lysyl oxidase: redox function for amino acid side chains*. Science, 1996. **273**(5278): p. 1078-84.
205. Layman, D.L., A.S. Narayanan, and G.R. Martin, *The production of lysyl oxidase by human fibroblasts in culture*. Arch Biochem Biophys, 1972. **149**(1): p. 97-101.
206. Byers, P.H., et al., *X-linked cutis laxa: defective cross-link formation in collagen due to decreased lysyl oxidase activity*. N Engl J Med, 1980. **303**(2): p. 61-5.
207. Peltonen, L., et al., *Alterations in copper and collagen metabolism in the Menkes syndrome and a new subtype of the Ehlers-Danlos syndrome*. Biochemistry, 1983. **22**(26): p. 6156-63.
208. Royce, P.M., J. Camakaris, and D.M. Danks, *Reduced lysyl oxidase activity in skin fibroblasts from patients with Menkes' syndrome*. Biochem J, 1980. **192**(2): p. 579-86.

BIBLIOGRAFIA

209. Kuivaniemi, H., L. Ala-Kokko, and K.I. Kivirikko, *Secretion of lysyl oxidase by cultured human skin fibroblasts and effects of monensin, nigericin, tunicamycin and colchicine*. Biochim Biophys Acta, 1986. **883**(2): p. 326-34.
210. Uzel, M.I., et al., *Multiple bone morphogenetic protein 1-related mammalian metalloproteinases process pro-lysyl oxidase at the correct physiological site and control lysyl oxidase activation in mouse embryo fibroblast cultures*. J Biol Chem, 2001. **276**(25): p. 22537-43.
211. Kagan, H.M. and P.C. Trackman, *Properties and function of lysyl oxidase*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1991. **5**(3): p. 206-10.
212. Cronshaw, A.D., L.A. Fothergill-Gilmore, and D.J. Hulmes, *The proteolytic processing site of the precursor of lysyl oxidase*. Biochem J, 1995. **306** (Pt 1): p. 279-84.
213. Panchenko, M.V., et al., *Metalloproteinase activity secreted by fibrogenic cells in the processing of prolysyl oxidase. Potential role of procollagen C-proteinase*. J Biol Chem, 1996. **271**(12): p. 7113-9.
214. Alcludia, J.F., et al., *Lysyl oxidase and endothelial dysfunction: mechanisms of lysyl oxidase down-regulation by pro-inflammatory cytokines*. Front Biosci, 2008. **13**: p. 2721-7.
215. Li, W., et al., *Localization and activity of lysyl oxidase within nuclei of fibrogenic cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(24): p. 12817-22.
216. Hurtado, P.A., et al., *Lysyl oxidase propeptide inhibits smooth muscle cell signaling and proliferation*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **366**(1): p. 156-61.
217. Schietke, R., et al., *The lysyl oxidases LOX and LOXL2 are necessary and sufficient to repress E-cadherin in hypoxia: insights into cellular transformation processes mediated by HIF-1*. J Biol Chem, 2010. **285**(9): p. 6658-69.
218. Kirschmann, D.A., et al., *A molecular role for lysyl oxidase in breast cancer invasion*. Cancer Res, 2002. **62**(15): p. 4478-83.
219. Erler, J.T., et al., *Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis*. Nature, 2006. **440**(7088): p. 1222-6.
220. Csiszar, K., *Lysyl oxidases: a novel multifunctional amine oxidase family*. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 2001. **70**: p. 1-32.
221. Williamson, P.R. and H.M. Kagan, *Reaction pathway of bovine aortic lysyl oxidase*. J Biol Chem, 1986. **261**(20): p. 9477-82.
222. Akagawa, M. and K. Suyama, *Characterization of a model compound for the lysine tyrosylquinone cofactor of lysyl oxidase*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **281**(1): p. 193-9.
223. Kagan, H.M., *Lysyl oxidase: mechanism, regulation and relationship to liver fibrosis*. Pathol Res Pract, 1994. **190**(9-10): p. 910-9.
224. Kagan, H.M., et al., *Influence of sequence and charge on the specificity of lysyl oxidase toward protein and synthetic peptide substrates*. J Biol Chem, 1984. **259**(18): p. 11203-7.

225. Li, W., et al., *Lysyl oxidase oxidizes basic fibroblast growth factor and inactivates its mitogenic potential*. J Cell Biochem, 2003. **88**(1): p. 152-64.
226. Csiszar, K., et al., *Functional analysis of the promoter and first intron of the human lysyl oxidase gene*. Mol Biol Rep, 1996. **23**(2): p. 97-108.
227. Uzel, M.I., et al., *Molecular events that contribute to lysyl oxidase enzyme activity and insoluble collagen accumulation in osteosarcoma cell clones*. J Bone Miner Res, 2000. **15**(6): p. 1189-97.
228. Fujimaki, T., et al., *Large-scale sequencing of the rabbit corneal endothelial cDNA library*. Cornea, 1999. **18**(1): p. 109-14.
229. Gregory, K.E., et al., *Abnormal collagen assembly, though normal phenotype, in alginate bead cultures of chick embryo chondrocytes*. Exp Cell Res, 1999. **246**(1): p. 98-107.
230. Casey, M.L. and P.C. MacDonald, *Lysyl oxidase (ras recision gene) expression in human amnion: ontogeny and cellular localization*. J Clin Endocrinol Metab, 1997. **82**(1): p. 167-72.
231. Jansen, M.K. and K. Csiszar, *Intracellular localization of the matrix enzyme lysyl oxidase in polarized epithelial cells*. Matrix Biol, 2007. **26**(2): p. 136-9.
232. Saad, F.A., et al., *Intracellular lysyl oxidase: effect of a specific inhibitor on nuclear mass in proliferating cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **396**(4): p. 944-9.
233. Nellaiappan, K., et al., *Fully processed lysyl oxidase catalyst translocates from the extracellular space into nuclei of aortic smooth-muscle cells*. J Cell Biochem, 2000. **79**(4): p. 576-82.
234. Mello, M.L., et al., *Modulation of ras transformation affecting chromatin supraorganization as assessed by image analysis*. Exp Cell Res, 1995. **220**(2): p. 374-82.
235. Kagan, H.M., et al., *Histone H1 is a substrate for lysyl oxidase and contains endogenous sodium borotritide-reducible residues*. Biochem Biophys Res Commun, 1983. **115**(1): p. 186-92.
236. Giampuzzi, M., R. Oleggini, and A. Di Donato, *Demonstration of in vitro interaction between tumor suppressor lysyl oxidase and histones H1 and H2: definition of the regions involved*. Biochim Biophys Acta, 2003. **1647**(1-2): p. 245-51.
237. Giampuzzi, M., et al., *Lysyl oxidase activates the transcription activity of human collagene III promoter. Possible involvement of Ku antigen*. J Biol Chem, 2000. **275**(46): p. 36341-9.
238. Oleggini, R., N. Gastaldo, and A. Di Donato, *Regulation of elastin promoter by lysyl oxidase and growth factors: cross control of lysyl oxidase on TGF-beta1 effects*. Matrix Biol, 2007. **26**(6): p. 494-505.
239. Giampuzzi, M., et al., *beta-catenin signaling and regulation of cyclin D1 promoter in NRK-49F cells transformed by down-regulation of the tumor suppressor lysyl oxidase*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1745**(3): p. 370-81.

BIBLIOGRAFIA

240. Song, Y.L., et al., *Regulation of lysyl oxidase by interferon-gamma in rat aortic smooth muscle cells*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000. **20**(4): p. 982-8.
241. Feres-Filho, E.J., G.B. Menassa, and P.C. Trackman, *Regulation of lysyl oxidase by basic fibroblast growth factor in osteoblastic MC3T3-E1 cells*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(11): p. 6411-6.
242. Trackman, P.C., et al., *Inflammation-associated lysyl oxidase protein expression in vivo, and modulation by FGF-2 plus IGF-1*. *Histochem Cell Biol*, 1998. **110**(1): p. 9-14.
243. Boak, A.M., et al., *Regulation of lysyl oxidase expression in lung fibroblasts by transforming growth factor-beta 1 and prostaglandin E2*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1994. **11**(6): p. 751-5.
244. Choung, J., et al., *Role of EP2 receptors and cAMP in prostaglandin E2 regulated expression of type I collagen alpha1, lysyl oxidase, and cyclooxygenase-1 genes in human embryo lung fibroblasts*. *J Cell Biochem*, 1998. **71**(2): p. 254-63.
245. Roy, R., et al., *Regulation of lysyl oxidase and cyclooxygenase expression in human lung fibroblasts: interactions among TGF-beta, IL-1 beta, and prostaglandin E*. *J Cell Biochem*, 1996. **62**(3): p. 411-7.
246. Bose, K.K., et al., *Lysyl oxidase activity in the cells of flexor retinaculum of individuals with carpal tunnel syndrome*. *J Occup Environ Med*, 2000. **42**(6): p. 582-7.
247. Feres-Filho, E.J., et al., *Pre- and post-translational regulation of lysyl oxidase by transforming growth factor-beta 1 in osteoblastic MC3T3-E1 cells*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(51): p. 30797-803.
248. Gacheru, S.N., et al., *Transcriptional and post-transcriptional control of lysyl oxidase expression in vascular smooth muscle cells: effects of TGF-beta 1 and serum deprivation*. *J Cell Biochem*, 1997. **65**(3): p. 395-407.
249. Hong, H.H., et al., *Regulation of lysyl oxidase, collagen, and connective tissue growth factor by TGF-beta1 and detection in human gingiva*. *Lab Invest*, 1999. **79**(12): p. 1655-67.
250. Shibanuma, M., et al., *Cloning from a mouse osteoblastic cell line of a set of transforming-growth-factor-beta 1-regulated genes, one of which seems to encode a follistatin-related polypeptide*. *Eur J Biochem*, 1993. **217**(1): p. 13-9.
251. Bronson, R.E., et al., *Stimulation of lysyl oxidase (EC 1.4.3.13) activity by testosterone and characterization of androgen receptors in cultured calf aorta smooth-muscle cells*. *Biochem J*, 1987. **244**(2): p. 317-23.
252. Ravid, K., et al., *Upregulation of lysyl oxidase in vascular smooth muscle cells by cAMP: role for adenosine receptor activation*. *J Cell Biochem*, 1999. **75**(1): p. 177-85.

253. Green, R.S., et al., *Identification of lysyl oxidase and other platelet-derived growth factor-inducible genes in vascular smooth muscle cells by differential screening*. Lab Invest, 1995. **73**(4): p. 476-82.
254. Smith-Mungo, L. and H.M. Kagan, *PKC-MEK-MAPK-dependent signal transduction pathway mediates the stimulation of lysyl oxidase expression by serum and PDGF in rat aortic smooth muscle cells*. J Cell Biochem, 2002. **85**(4): p. 775-84.
255. Rodriguez, C., et al., *Low density lipoproteins downregulate lysyl oxidase in vascular endothelial cells and the arterial wall*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. **22**(9): p. 1409-14.
256. Pischon, N., et al., *Regulation of collagen deposition and lysyl oxidase by tumor necrosis factor-alpha in osteoblasts*. J Biol Chem, 2004. **279**(29): p. 30060-5.
257. Rodriguez, C., et al., *Lysyl oxidase (LOX) down-regulation by TNFalpha: a new mechanism underlying TNFalpha-induced endothelial dysfunction*. Atherosclerosis, 2008. **196**(2): p. 558-64.
258. Voloshenyuk, T.G., et al., *TNF-alpha increases cardiac fibroblast lysyl oxidase expression through TGF-beta and PI3Kinase signaling pathways*. Biochem Biophys Res Commun. **413**(2): p. 370-5.
259. Raposo, B., et al., *High levels of homocysteine inhibit lysyl oxidase (LOX) and downregulate LOX expression in vascular endothelial cells*. Atherosclerosis, 2004. **177**(1): p. 1-8.
260. Fogelgren, B., et al., *Cellular fibronectin binds to lysyl oxidase with high affinity and is critical for its proteolytic activation*. J Biol Chem, 2005. **280**(26): p. 24690-7.
261. Huang, G., et al., *Fibronectin binds and enhances the activity of bone morphogenetic protein 1*. J Biol Chem, 2009. **284**(38): p. 25879-88.
262. Wachi, H., et al., *Endothelin-1 Down-Regulates Expression of Tropoelastin and Lysyl Oxidase mRNA in Cultured Chick Aortic Smooth Muscle Cells*. Journal of Health Science, 2001. **47**(6): p. 525-532.
263. Guo, Y., et al., *Intracellular distribution of the lysyl oxidase propeptide in osteoblastic cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **292**(6): p. C2095-102.
264. Li, J., et al., *Nna1 mediates Purkinje cell dendritic development via lysyl oxidase propeptide and NF-kappaB signaling*. Neuron, 2010. **68**(1): p. 45-60.
265. Futaki, S., et al., *Translocation of branched-chain arginine peptides through cell membranes: flexibility in the spatial disposition of positive charges in membrane-permeable peptides*. Biochemistry, 2002. **41**(25): p. 7925-30.
266. Palamakumbura, A.H., et al., *The propeptide domain of lysyl oxidase induces phenotypic reversion of ras-transformed cells*. J Biol Chem, 2004. **279**(39): p. 40593-600.

BIBLIOGRAFIA

267. Nakai, K. and P. Horton, *PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization*. Trends Biochem Sci, 1999. **24**(1): p. 34-6.
268. Maki, J.M., et al., *Lysyl oxidase is essential for normal development and function of the respiratory system and for the integrity of elastic and collagen fibers in various tissues*. Am J Pathol, 2005. **167**(4): p. 927-36.
269. Lohler, J., R. Timpl, and R. Jaenisch, *Embryonic lethal mutation in mouse collagen I gene causes rupture of blood vessels and is associated with erythropoietic and mesenchymal cell death*. Cell, 1984. **38**(2): p. 597-607.
270. Poschl, E., et al., *Collagen IV is essential for basement membrane stability but dispensable for initiation of its assembly during early development*. Development, 2004. **131**(7): p. 1619-28.
271. Maki, J.M., *Lysyl oxidases in mammalian development and certain pathological conditions*. Histol Histopathol, 2009. **24**(5): p. 651-60.
272. Di Donato, A., et al., *Lysyl oxidase expression and collagen cross-linking during chronic adriamycin nephropathy*. Nephron, 1997. **76**(2): p. 192-200.
273. Desmouliere, A., et al., *Extracellular matrix deposition, lysyl oxidase expression, and myofibroblastic differentiation during the initial stages of cholestatic fibrosis in the rat*. Lab Invest, 1997. **76**(6): p. 765-78.
274. Sivakumar, P., et al., *Upregulation of lysyl oxidase and MMPs during cardiac remodeling in human dilated cardiomyopathy*. Mol Cell Biochem, 2008. **307**(1-2): p. 159-67.
275. Tzortzaki, E.G., et al., *Expression of FACIT collagens XII and XIV during bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice*. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol, 2003. **275**(2): p. 1073-80.
276. Vadasz, Z., et al., *Abnormal deposition of collagen around hepatocytes in Wilson's disease is associated with hepatocyte specific expression of lysyl oxidase and lysyl oxidase like protein-2*. J Hepatol, 2005. **43**(3): p. 499-507.
277. Lopez, B., et al., *Impact of treatment on myocardial lysyl oxidase expression and collagen cross-linking in patients with heart failure*. Hypertension, 2009. **53**(2): p. 236-42.
278. Lee, S., et al., *Transforming growth factor-beta regulation of bone morphogenetic protein-1/procollagen C-proteinase and related proteins in fibrogenic cells and keratinocytes*. J Biol Chem, 1997. **272**(30): p. 19059-66.
279. Shanley, C.J., et al., *Transforming growth factor-beta 1 increases lysyl oxidase enzyme activity and mRNA in rat aortic smooth muscle cells*. J Vasc Surg, 1997. **25**(3): p. 446-52.
280. Gilad, G.M., H.M. Kagan, and V.H. Gilad, *Evidence for increased lysyl oxidase, the extracellular matrix-forming enzyme, in Alzheimer's disease brain*. Neurosci Lett, 2005. **376**(3): p. 210-4.
281. Li, P.A., et al., *Up-regulation and altered distribution of lysyl oxidase in the central nervous system of mutant SOD1 transgenic mouse model of*

- amyotrophic lateral sclerosis*. Brain Res Mol Brain Res, 2004. **120**(2): p. 115-22.
282. Payne, S.L., M.J. Hendrix, and D.A. Kirschmann, *Paradoxical roles for lysyl oxidases in cancer--a prospect*. J Cell Biochem, 2007. **101**(6): p. 1338-54.
283. Gao, S., et al., *Transcriptional and posttranscriptional inhibition of lysyl oxidase expression by cigarette smoke condensate in cultured rat fetal lung fibroblasts*. Toxicol Sci, 2005. **87**(1): p. 197-203.
284. Osman, M., et al., *Cigarette smoke impairs elastin resynthesis in lungs of hamsters with elastase-induced emphysema*. Am Rev Respir Dis, 1985. **132**(3): p. 640-3.
285. Contente, S., et al., *Expression of gene rrg is associated with reversion of NIH 3T3 transformed by LTR-c-H-ras*. Science, 1990. **249**(4970): p. 796-8.
286. Borczuk, A.C., et al., *Lung adenocarcinoma global profiling identifies type II transforming growth factor-beta receptor as a repressor of invasiveness*. Am J Respir Crit Care Med, 2005. **172**(6): p. 729-37.
287. Kuivaniemi, H., et al., *Deficient production of lysyl oxidase in cultures of malignantly transformed human cells*. FEBS Lett, 1986. **195**(1-2): p. 261-4.
288. Bouez, C., et al., *The lysyl oxidase LOX is absent in basal and squamous cell carcinomas and its knockdown induces an invading phenotype in a skin equivalent model*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(5): p. 1463-9.
289. Csiszar, K., et al., *Somatic mutations of the lysyl oxidase gene on chromosome 5q23.1 in colorectal tumors*. Int J Cancer, 2002. **97**(5): p. 636-42.
290. Kaneda, A., et al., *Lysyl oxidase is a tumor suppressor gene inactivated by methylation and loss of heterozygosity in human gastric cancers*. Cancer Res, 2004. **64**(18): p. 6410-5.
291. Ren, C., et al., *Reduced lysyl oxidase messenger RNA levels in experimental and human prostate cancer*. Cancer Res, 1998. **58**(6): p. 1285-90.
292. Giampuzzi, M., et al., *Down-regulation of lysyl oxidase-induced tumorigenic transformation in NRK-49F cells characterized by constitutive activation of ras proto-oncogene*. J Biol Chem, 2001. **276**(31): p. 29226-32.
293. Wu, M., et al., *Repression of BCL2 by the tumor suppressor activity of the lysyl oxidase propeptide inhibits transformed phenotype of lung and pancreatic cancer cells*. Cancer Res, 2007. **67**(13): p. 6278-85.
294. Jeay, S., et al., *Lysyl oxidase inhibits ras-mediated transformation by preventing activation of NF-kappa B*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(7): p. 2251-63.
295. Min, C., et al., *The tumor suppressor activity of the lysyl oxidase propeptide reverses the invasive phenotype of Her-2/neu-driven breast cancer*. Cancer Res, 2007. **67**(3): p. 1105-12.
296. Zhao, Y., et al., *The lysyl oxidase pro-peptide attenuates fibronectin-mediated activation of focal adhesion kinase and p130Cas in breast cancer cells*. J Biol Chem, 2009. **284**(3): p. 1385-93.

BIBLIOGRAFIA

297. Kirschmann, D.A., et al., *Differentially expressed genes associated with the metastatic phenotype in breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 1999. **55**(2): p. 127-36.
298. Stassar, M.J., et al., *Identification of human renal cell carcinoma associated genes by suppression subtractive hybridization*. Br J Cancer, 2001. **85**(9): p. 1372-82.
299. Helleman, J., et al., *Association of an extracellular matrix gene cluster with breast cancer prognosis and endocrine therapy response*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(17): p. 5555-64.
300. Payne, S.L., et al., *Lysyl oxidase regulates breast cancer cell migration and adhesion through a hydrogen peroxide-mediated mechanism*. Cancer Res, 2005. **65**(24): p. 11429-36.
301. Payne, S.L., M.J. Hendrix, and D.A. Kirschmann, *Lysyl oxidase regulates actin filament formation through the p130(Cas)/Crk/DOCK180 signaling complex*. J Cell Biochem, 2006. **98**(4): p. 827-37.
302. Postovit, L.M., et al., *Hypoxia/reoxygenation: a dynamic regulator of lysyl oxidase-facilitated breast cancer migration*. J Cell Biochem, 2008. **103**(5): p. 1369-78.
303. Higgins, D.F., et al., *Hypoxia promotes fibrogenesis in vivo via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition*. J Clin Invest, 2007. **117**(12): p. 3810-20.
304. Sahlgren, C., et al., *Notch signaling mediates hypoxia-induced tumor cell migration and invasion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(17): p. 6392-7.
305. Erler, J.T., et al., *Hypoxia-induced lysyl oxidase is a critical mediator of bone marrow cell recruitment to form the premetastatic niche*. Cancer Cell, 2009. **15**(1): p. 35-44.
306. Wong, C.C., et al., *Hypoxia-inducible factor 1 is a master regulator of breast cancer metastatic niche formation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(39): p. 16369-74.
307. Kaplan, R.N., et al., *VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche*. Nature, 2005. **438**(7069): p. 820-7.
308. Condeelis, J. and J.W. Pollard, *Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis*. Cell, 2006. **124**(2): p. 263-6.
309. Coussens, L.M. and Z. Werb, *Inflammation and cancer*. Nature, 2002. **420**(6917): p. 860-7.
310. Pez, F., et al., *The HIF-1-inducible lysyl oxidase activates HIF-1 via the Akt pathway in a positive regulation loop and synergizes with HIF-1 in promoting tumor cell growth*. Cancer Res, 2011. **71**(5): p. 1647-57.
311. Oleggini, R. and A. Di Donato, *Lysyl oxidase regulates MMTV promoter: indirect evidence of histone H1 involvement*. Biochem Cell Biol, 2011. **89**(6): p. 522-32.

312. Barath, P., et al., *Detection and localization of tumor necrosis factor in human atheroma*. Am J Cardiol, 1990. **65**(5): p. 297-302.
313. Rodriguez, C., et al., *Statins normalize vascular lysyl oxidase down-regulation induced by proatherogenic risk factors*. Cardiovasc Res, 2009. **83**(3): p. 595-603.
314. O'Driscoll, G., D. Green, and R.R. Taylor, *Simvastatin, an HMG-coenzyme A reductase inhibitor, improves endothelial function within 1 month*. Circulation, 1997. **95**(5): p. 1126-31.
315. Wassmann, S., et al., *Rapid effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibition on coronary endothelial function*. Circ Res, 2003. **93**(9): p. e98-103.
316. Martínez-González, J., *Molecular mechanisms underlying the lipid-independent effects of statins: clinical relevance*. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2006. **99**: p. 10-12.
317. Lahera, V., et al., *Endothelial dysfunction, oxidative stress and inflammation in atherosclerosis: beneficial effects of statins*. Curr Med Chem, 2007. **14**(2): p. 243-8.
318. Martinez-Gonzalez, J. and L. Badimon, *Influence of statin use on endothelial function: from bench to clinics*. Curr Pharm Des, 2007. **13**(17): p. 1771-86.
319. Lazarus, H.M., et al., *Induction of human monocyte motility by lysyl oxidase*. Matrix Biol, 1995. **14**(9): p. 727-31.
320. Li, W., et al., *Hydrogen peroxide-mediated, lysyl oxidase-dependent chemotaxis of vascular smooth muscle cells*. J Cell Biochem, 2000. **78**(4): p. 550-7.
321. Ferns, G.A., et al., *Inhibition of neointimal smooth muscle accumulation after angioplasty by an antibody to PDGF*. Science, 1991. **253**(5024): p. 1129-32.
322. Lucero, H.A., et al., *Lysyl oxidase oxidizes cell membrane proteins and enhances the chemotactic response of vascular smooth muscle cells*. J Biol Chem, 2008. **283**(35): p. 24103-17.
323. Weissen-Plenz, G., et al., *Granulocyte macrophage colony-stimulating factor deficiency affects vascular elastin production and integrity of elastic lamellae*. J Vasc Res, 2008. **45**(2): p. 103-10.
324. Kagan, H.M., J. Raghavan, and W. Hollander, *Changes in aortic lysyl oxidase activity in diet-induced atherosclerosis in the rabbit*. Arteriosclerosis, 1981. **1**(4): p. 287-91.
325. Nuthakki, V.K., et al., *Lysyl oxidase expression in a rat model of arterial balloon injury*. J Vasc Surg, 2004. **40**(1): p. 123-9.
326. Casani, L., et al., *Pravastatin reduces thrombogenicity by mechanisms beyond plasma cholesterol lowering*. Thromb Haemost, 2005. **94**(5): p. 1035-41.

BIBLIOGRAFIA

327. Libby, P., et al., *Cytokines regulate vascular functions related to stability of the atherosclerotic plaque*. J Cardiovasc Pharmacol, 1995. **25 Suppl 2**: p. S9-12.
328. Kagan, H.M., *Biology of the Extracellular Matrix: Regulation of Matrix Accumulation*. New York, NY: Academic Press Inc, 1986.
329. Schieffer, B., et al., *Impact of interleukin-6 on plaque development and morphology in experimental atherosclerosis*. Circulation, 2004. **110**(22): p. 3493-500.
330. Majesky, M.W., et al., *PDGF ligand and receptor gene expression during repair of arterial injury*. J Cell Biol, 1990. **111**(5 Pt 1): p. 2149-58.
331. Tanaka, H., et al., *Proliferating arterial smooth muscle cells after balloon injury express TNF-alpha but not interleukin-1 or basic fibroblast growth factor*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1996. **16**(1): p. 12-8.
332. Bruel, A., G. Ortoft, and H. Oxlund, *Inhibition of cross-links in collagen is associated with reduced stiffness of the aorta in young rats*. Atherosclerosis, 1998. **140**(1): p. 135-45.
333. Nakashima, Y. and K. Sueishi, *Alteration of elastic architecture in the lathyrin rat aorta implies the pathogenesis of aortic dissecting aneurysm*. Am J Pathol, 1992. **140**(4): p. 959-69.
334. Yoshimura, K., et al., *Regression of abdominal aortic aneurysm by inhibition of c-Jun N-terminal kinase in mice*. Ann N Y Acad Sci, 2006. **1085**: p. 74-81.
335. Aoki, T., et al., *Reduced collagen biosynthesis is the hallmark of cerebral aneurysm: contribution of interleukin-1beta and nuclear factor-kappaB*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009. **29**(7): p. 1080-6.
336. Onoda, M., et al., *Lysyl oxidase resolves inflammation by reducing monocyte chemoattractant protein-1 in abdominal aortic aneurysm*. Atherosclerosis, 2010. **208**(2): p. 366-9.
337. Seyama, Y. and H. Wachi, *Atherosclerosis and matrix dystrophy*. J Atheroscler Thromb, 2004. **11**(5): p. 236-45.
338. Sibon, I., et al., *Lysyl oxidase deficiency: a new cause of human arterial dissection*. Heart, 2005. **91**(5): p. e33.
339. Choi, J., et al., *Analysis of dermal elastic fibers in the absence of fibulin-5 reveals potential roles for fibulin-5 in elastic fiber assembly*. Matrix Biol, 2009. **28**(4): p. 211-20.
340. Kowal, R.C., et al., *EVEC, a novel epidermal growth factor-like repeat-containing protein upregulated in embryonic and diseased adult vasculature*. Circ Res, 1999. **84**(10): p. 1166-76.
341. Nakamura, T., et al., *Fibulin-5/DANCE is essential for elastogenesis in vivo*. Nature, 2002. **415**(6868): p. 171-5.
342. Nonaka, R., et al., *DANCE/fibulin-5 promotes elastic fiber formation in a tropoelastin isoform-dependent manner*. Clin Biochem, 2009. **42**(7-8): p. 713-21.

343. Yanagisawa, H., et al., *Fibulin-5 is an elastin-binding protein essential for elastic fibre development in vivo*. Nature, 2002. **415**(6868): p. 168-71.
344. Nakamura, T., et al., *DANCE, a novel secreted RGD protein expressed in developing, atherosclerotic, and balloon-injured arteries*. J Biol Chem, 1999. **274**(32): p. 22476-83.
345. Argraves, W.S., et al., *Fibulins: physiological and disease perspectives*. EMBO Rep, 2003. **4**(12): p. 1127-31.
346. Albig, A.R. and W.P. Schiemann, *Fibulin-5 function during tumorigenesis*. Future Oncol, 2005. **1**(1): p. 23-35.
347. de Vega, S., T. Iwamoto, and Y. Yamada, *Fibulins: multiple roles in matrix structures and tissue functions*. Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(11-12): p. 1890-902.
348. Yanagisawa, H., M.K. Schluterman, and R.A. Brekken, *Fibulin-5, an integrin-binding matricellular protein: its function in development and disease*. J Cell Commun Signal, 2009. **3**(3-4): p. 337-47.
349. Downing, A.K., et al., *Solution structure of a pair of calcium-binding epidermal growth factor-like domains: implications for the Marfan syndrome and other genetic disorders*. Cell, 1996. **85**(4): p. 597-605.
350. Maurer, P. and E. Hohenester, *Structural and functional aspects of calcium binding in extracellular matrix proteins*. Matrix Biol, 1997. **15**(8-9): p. 569-80; discussion 581.
351. Ruoslahti, E. and M.D. Pierschbacher, *New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins*. Science, 1987. **238**(4826): p. 491-7.
352. Booms, P., et al., *RGD-containing fibrillin-1 fragments upregulate matrix metalloproteinase expression in cell culture: a potential factor in the pathogenesis of the Marfan syndrome*. Hum Genet, 2005. **116**(1-2): p. 51-61.
353. Carson, A.E. and T.H. Barker, *Emerging concepts in engineering extracellular matrix variants for directing cell phenotype*. Regen Med, 2009. **4**(4): p. 593-600.
354. Huveneers, S., et al., *Binding of soluble fibronectin to integrin alpha5 beta1 - link to focal adhesion redistribution and contractile shape*. J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 15): p. 2452-62.
355. Zheng, Q., et al., *Molecular analysis of fibulin-5 function during de novo synthesis of elastic fibers*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(3): p. 1083-95.
356. Jones, R.P., et al., *Fibulin 5 forms a compact dimer in physiological solutions*. J Biol Chem, 2009. **284**(38): p. 25938-43.
357. Wachi, H., et al., *Characterization of the molecular interaction between tropoelastin and DANCE/fibulin-5*. J Biochem, 2008. **143**(5): p. 633-9.
358. Hirai, M., et al., *Fibulin-5/DANCE has an elastogenic organizer activity that is abrogated by proteolytic cleavage in vivo*. J Cell Biol, 2007. **176**(7): p. 1061-71.

BIBLIOGRAFIA

359. Liu, X., et al., *Elastic fiber homeostasis requires lysyl oxidase-like 1 protein*. Nat Genet, 2004. **36**(2): p. 178-82.
360. Zanetti, M., et al., *EMILIN-1 deficiency induces elastogenesis and vascular cell defects*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(2): p. 638-50.
361. Hirai, M., et al., *Latent TGF-beta-binding protein 2 binds to DANCE/fibulin-5 and regulates elastic fiber assembly*. EMBO J, 2007. **26**(14): p. 3283-95.
362. Freeman, L.J., et al., *Fibulin-5 interacts with fibrillin-1 molecules and microfibrils*. Biochem J, 2005. **388**(Pt 1): p. 1-5.
363. Choudhury, R., et al., *Differential regulation of elastic fiber formation by fibulin-4 and -5*. J Biol Chem, 2009. **284**(36): p. 24553-67.
364. Nguyen, A.D., et al., *Fibulin-5 is a novel binding protein for extracellular superoxide dismutase*. Circ Res, 2004. **95**(11): p. 1067-74.
365. Lomas, A.C., et al., *Fibulin-5 binds human smooth-muscle cells through alpha5beta1 and alpha4beta1 integrins, but does not support receptor activation*. Biochem J, 2007. **405**(3): p. 417-28.
366. Kapetanopoulos, A., et al., *Direct interaction of the extracellular matrix protein DANCE with apolipoprotein(a) mediated by the kringle IV-type 2 domain*. Mol Genet Genomics, 2002. **267**(4): p. 440-6.
367. Schiemann, W.P., et al., *Context-specific effects of fibulin-5 (DANCE/EVEC) on cell proliferation, motility, and invasion. Fibulin-5 is induced by transforming growth factor-beta and affects protein kinase cascades*. J Biol Chem, 2002. **277**(30): p. 27367-77.
368. Albig, A.R. and W.P. Schiemann, *Fibulin-5 antagonizes vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling and angiogenic sprouting by endothelial cells*. DNA Cell Biol, 2004. **23**(6): p. 367-79.
369. Guo, Q.M., et al., *Identification of c-myc responsive genes using rat cDNA microarray*. Cancer Res, 2000. **60**(21): p. 5922-8.
370. Watson, J.D., et al., *Identifying genes regulated in a Myc-dependent manner*. J Biol Chem, 2002. **277**(40): p. 36921-30.
371. Kuang, P.P., et al., *Coordinate expression of fibulin-5/DANCE and elastin during lung injury repair*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2003. **285**(5): p. L1147-52.
372. Tsuruga, E., T. Yajima, and K. Irie, *Induction of fibulin-5 gene is regulated by tropoelastin gene, and correlated with tropoelastin accumulation in vitro*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(3): p. 395-400.
373. Spencer, J.A., et al., *Altered vascular remodeling in fibulin-5-deficient mice reveals a role of fibulin-5 in smooth muscle cell proliferation and migration*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(8): p. 2946-51.
374. Preis, M., et al., *Effects of fibulin-5 on attachment, adhesion, and proliferation of primary human endothelial cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **348**(3): p. 1024-33.
375. Rodriguez-Manzaneque, J.C., et al., *Thrombospondin-1 suppresses spontaneous tumor growth and inhibits activation of matrix*

- metalloproteinase-9 and mobilization of vascular endothelial growth factor.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(22): p. 12485-90.
376. Lee, Y.H., et al., *Fibulin-5 initiates epithelial-mesenchymal transition (EMT) and enhances EMT induced by TGF-beta in mammary epithelial cells via a MMP-dependent mechanism.* Carcinogenesis, 2008. **29**(12): p. 2243-51.
377. Yue, W., et al., *Fibulin-5 suppresses lung cancer invasion by inhibiting matrix metalloproteinase-7 expression.* Cancer Res, 2009. **69**(15): p. 6339-46.
378. Budatha, M., et al., *Extracellular matrix proteases contribute to progression of pelvic organ prolapse in mice and humans.* J Clin Invest, 2011. **121**(5): p. 2048-59.
379. Bellingham, C.M., et al., *Recombinant human elastin polypeptides self-assemble into biomaterials with elastin-like properties.* Biopolymers, 2003. **70**(4): p. 445-55.
380. Cox, B.A., B.C. Starcher, and D.W. Urry, *Communication: Coacervation of tropoelastin results in fiber formation.* J Biol Chem, 1974. **249**(3): p. 997-8.
381. Vrhovski, B., S. Jensen, and A.S. Weiss, *Coacervation characteristics of recombinant human tropoelastin.* Eur J Biochem, 1997. **250**(1): p. 92-8.
382. Urry, D.W., *Entropic elastic processes in protein mechanisms. I. Elastic structure due to an inverse temperature transition and elasticity due to internal chain dynamics.* J Protein Chem, 1988. **7**(1): p. 1-34.
383. Cirulis, J.T., et al., *Fibrillins, fibulins, and matrix-associated glycoprotein modulate the kinetics and morphology of in vitro self-assembly of a recombinant elastin-like polypeptide.* Biochemistry, 2008. **47**(47): p. 12601-13.
384. Czirok, A., et al., *Elastic fiber macro-assembly is a hierarchical, cell motion-mediated process.* J Cell Physiol, 2006. **207**(1): p. 97-106.
385. Kozel, B.A., et al., *Elastic fiber formation: a dynamic view of extracellular matrix assembly using timer reporters.* J Cell Physiol, 2006. **207**(1): p. 87-96.
386. Kobayashi, N., et al., *A comparative analysis of the fibulin protein family. Biochemical characterization, binding interactions, and tissue localization.* J Biol Chem, 2007. **282**(16): p. 11805-16.
387. El-Hallous, E., et al., *Fibrillin-1 interactions with fibulins depend on the first hybrid domain and provide an adaptor function to tropoelastin.* J Biol Chem, 2007. **282**(12): p. 8935-46.
388. Clarke, A.W., et al., *Coacervation is promoted by molecular interactions between the PF2 segment of fibrillin-1 and the domain 4 region of tropoelastin.* Biochemistry, 2005. **44**(30): p. 10271-81.
389. Yanagisawa, H. and E.C. Davis, *Unraveling the mechanism of elastic fiber assembly: The roles of short fibulins.* Int J Biochem Cell Biol, 2010. **42**(7): p. 1084-93.

BIBLIOGRAFIA

390. Thomassin, L., et al., *The Pro-regions of lysyl oxidase and lysyl oxidase-like 1 are required for deposition onto elastic fibers*. J Biol Chem, 2005. **280**(52): p. 42848-55.
391. Chapman, S.L., et al., *Fibulin-2 and fibulin-5 cooperatively function to form the internal elastic lamina and protect from vascular injury*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010. **30**(1): p. 68-74.
392. Carmeliet, P., *Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis*. Nat Med, 2000. **6**(4): p. 389-95.
393. Liekens, S., E. De Clercq, and J. Neyts, *Angiogenesis: regulators and clinical applications*. Biochem Pharmacol, 2001. **61**(3): p. 253-70.
394. Sanz, L. and L. Alvarez-Vallina, *The extracellular matrix: a new turn-of-the-screw for anti-angiogenic strategies*. Trends Mol Med, 2003. **9**(6): p. 256-62.
395. Sottile, J., *Regulation of angiogenesis by extracellular matrix*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1654**(1): p. 13-22.
396. Zheng, Q., et al., *Normal wound healing in mice deficient for fibulin-5, an elastin binding protein essential for dermal elastic fiber assembly*. J Invest Dermatol, 2006. **126**(12): p. 2707-14.
397. Sullivan, K.M., et al., *Fibulin-5 functions as an endogenous angiogenesis inhibitor*. Lab Invest, 2007. **87**(8): p. 818-27.
398. Albig, A.R., J.R. Neil, and W.P. Schiemann, *Fibulins 3 and 5 antagonize tumor angiogenesis in vivo*. Cancer Res, 2006. **66**(5): p. 2621-9.
399. Guo, N., et al., *Thrombospondin 1 and type I repeat peptides of thrombospondin 1 specifically induce apoptosis of endothelial cells*. Cancer Res, 1997. **57**(9): p. 1735-42.
400. Kadoya, K., et al., *Fibulin-5 deposition in human skin: decrease with ageing and ultraviolet B exposure and increase in solar elastosis*. Br J Dermatol, 2005. **153**(3): p. 607-12.
401. Takacs, P., et al., *Fibulin-5 expression is decreased in women with anterior vaginal wall prolapse*. Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct, 2009. **20**(2): p. 207-11.
402. Loeys, B., et al., *Homozygosity for a missense mutation in fibulin-5 (FBLN5) results in a severe form of cutis laxa*. Hum Mol Genet, 2002. **11**(18): p. 2113-8.
403. Markova, D., et al., *Genetic heterogeneity of cutis laxa: a heterozygous tandem duplication within the fibulin-5 (FBLN5) gene*. Am J Hum Genet, 2003. **72**(4): p. 998-1004.
404. Stone, E.M., et al., *Missense variations in the fibulin 5 gene and age-related macular degeneration*. N Engl J Med, 2004. **351**(4): p. 346-53.
405. Lotery, A.J., et al., *Reduced secretion of fibulin 5 in age-related macular degeneration and cutis laxa*. Hum Mutat, 2006. **27**(6): p. 568-74.

406. Xie, L., et al., *Basement membrane derived fibulin-1 and fibulin-5 function as angiogenesis inhibitors and suppress tumor growth*. Exp Biol Med (Maywood), 2008. **233**(2): p. 155-62.
407. Moller, H.D., et al., *Role of fibulin-5 in metastatic organ colonization*. Mol Cancer Res, 2011. **9**(5): p. 553-63.
408. Cornhill, J.F. and M.R. Roach, *A quantitative study of the localization of atherosclerotic lesions in the rabbit aorta*. Atherosclerosis, 1976. **23**(3): p. 489-501.
409. Giddens, D.P., C.K. Zarins, and S. Glagov, *The role of fluid mechanics in the localization and detection of atherosclerosis*. J Biomech Eng, 1993. **115**(4B): p. 588-94.
410. Jean, J.C., et al., *DANCE in developing and injured lung*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002. **282**(1): p. L75-82.
411. Fukai, T., et al., *Vascular expression of extracellular superoxide dismutase in atherosclerosis*. J Clin Invest, 1998. **101**(10): p. 2101-11.
412. Schluterman, M.K., et al., *Loss of fibulin-5 binding to β 1 integrins inhibits tumor growth by increasing the level of ROS*. Dis Model Mech, 2010. **3**(5-6): p. 333-42.
413. Lees-Miller, J.P., et al., *Isolation and characterization of an abundant and novel 22-kDa protein (SM22) from chicken gizzard smooth muscle*. J Biol Chem, 1987. **262**(7): p. 2988-93.
414. Pearlstone, J.R., et al., *Amino acid sequence of chicken gizzard smooth muscle SM22 alpha*. J Biol Chem, 1987. **262**(13): p. 5985-91.
415. Martinez-Gonzalez, J., et al., *Mevalonate deprivation impairs IGF-I/insulin signaling in human vascular smooth muscle cells*. Atherosclerosis, 1997. **135**(2): p. 213-23.
416. Hanahan, D., *Technique for transformation of E. coli. DNA cloning: A practical approach*. Glover DM. Ed IRL Press, Oxford, 1985. **2**: p. 109-135.
417. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem, 1987. **162**(1): p. 156-9.
418. Bolstad, B.M., et al., *A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias*. Bioinformatics, 2003. **19**(2): p. 185-93.
419. Kerr, M.K., *Linear models for microarray data analysis: hidden similarities and differences*. J Comput Biol, 2003. **10**(6): p. 891-901.
420. Benjamini, Y., et al., *Controlling the false discovery rate in behavior genetics research*. Behav Brain Res, 2001. **125**(1-2): p. 279-84.
421. Klipper-Aurbach, Y., et al., *Mathematical formulae for the prediction of the residual beta cell function during the first two years of disease in children and adolescents with insulin-dependent diabetes mellitus*. Med Hypotheses, 1995. **45**(5): p. 486-90.

BIBLIOGRAFIA

422. Gonzalez-Diez, M., et al., *Prostacyclin induction by high-density lipoprotein (HDL) in vascular smooth muscle cells depends on sphingosine 1-phosphate receptors: effect of simvastatin*. *Thromb Haemost*, 2008. **100**(1): p. 119-26.
423. Smith, P.K., et al., *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. *Anal Biochem*, 1985. **150**(1): p. 76-85.
424. Martorell, L., et al., *The hypoxia-inducible factor 1/NOR-1 axis regulates the survival response of endothelial cells to hypoxia*. *Mol Cell Biol*, 2009. **29**(21): p. 5828-42.
425. Simon, M.C., *Mitochondrial reactive oxygen species are required for hypoxic HIF alpha stabilization*. *Adv Exp Med Biol*, 2006. **588**: p. 165-70.
426. Akman, H.O., et al., *Response to hypoxia involves transforming growth factor-beta2 and Smad proteins in human endothelial cells*. *Blood*, 2001. **98**(12): p. 3324-31.
427. Yanagisawa, J., et al., *Convergence of transforming growth factor-beta and vitamin D signaling pathways on SMAD transcriptional coactivators*. *Science*, 1999. **283**(5406): p. 1317-21.
428. Fandrey, J., *Oxygen-dependent and tissue-specific regulation of erythropoietin gene expression*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2004. **286**(6): p. R977-88.
429. Rodriguez, C., et al., *Regulation of lysyl oxidase in vascular cells: lysyl oxidase as a new player in cardiovascular diseases*. *Cardiovasc Res*, 2008. **79**(1): p. 7-13.
430. Rodriguez, C., A. Rodriguez-Sinovas, and J. Martinez-Gonzalez, *Lysyl oxidase as a potential therapeutic target*. *Drug News Perspect*, 2008. **21**(4): p. 218-24.
431. Kumar, A. and V. Lindner, *Remodeling with neointima formation in the mouse carotid artery after cessation of blood flow*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997. **17**(10): p. 2238-44.
432. Furgeson, S.B., et al., *Inactivation of the tumour suppressor, PTEN, in smooth muscle promotes a pro-inflammatory phenotype and enhances neointima formation*. *Cardiovasc Res*, 2010. **86**(2): p. 274-82.
433. Godin, D., et al., *Remodeling of carotid artery is associated with increased expression of matrix metalloproteinases in mouse blood flow cessation model*. *Circulation*, 2000. **102**(23): p. 2861-6.
434. Harmon, K.J., L.L. Couper, and V. Lindner, *Strain-dependent vascular remodeling phenotypes in inbred mice*. *Am J Pathol*, 2000. **156**(5): p. 1741-8.
435. Kawasaki, T., et al., *Mouse carotid artery ligation induces platelet-leukocyte-dependent luminal fibrin, required for neointima development*. *Circ Res*, 2001. **88**(2): p. 159-66.
436. Kojima, Y., et al., *Upregulation of the apelin-APJ pathway promotes neointima formation in the carotid ligation model in mouse*. *Cardiovasc Res*, 2010. **87**(1): p. 156-65.

437. Kuzuya, M., et al., *Deficiency of gelatinase a suppresses smooth muscle cell invasion and development of experimental intimal hyperplasia*. *Circulation*, 2003. **108**(11): p. 1375-81.
438. Sindermann, J.R., et al., *Direct evidence for the importance of p130 in injury response and arterial remodeling following carotid artery ligation*. *Cardiovasc Res*, 2002. **54**(3): p. 676-83.
439. Hu, C.J., et al., *Differential roles of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in hypoxic gene regulation*. *Mol Cell Biol*, 2003. **23**(24): p. 9361-74.
440. Kuang, P.P., et al., *Fibulin-5 gene expression in human lung fibroblasts is regulated by TGF-beta and phosphatidylinositol 3-kinase activity*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2006. **291**(6): p. C1412-21.
441. Lopez, B., et al., *Role of lysyl oxidase in myocardial fibrosis: from basic science to clinical aspects*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010. **299**(1): p. H1-9.
442. Kim, Y.M., E.C. Kim, and Y. Kim, *The human lysyl oxidase-like 2 protein functions as an amine oxidase toward collagen and elastin*. *Mol Biol Rep*, 2011. **38**(1): p. 145-9.
443. Bignon, M., et al., *Lysyl oxidase-like protein-2 regulates sprouting angiogenesis and type IV collagen assembly in the endothelial basement membrane*. *Blood*, 2011. **118**(14): p. 3979-89.
444. Kuwahara, F., et al., *Hypoxia-inducible factor-1alpha/vascular endothelial growth factor pathway for adventitial vasa vasorum formation in hypertensive rat aorta*. *Hypertension*, 2002. **39**(1): p. 46-50.
445. Hanze, J., et al., *Cellular and molecular mechanisms of hypoxia-inducible factor driven vascular remodeling*. *Thromb Haemost*, 2007. **97**(5): p. 774-87.
446. Rankin, E.B. and A.J. Giaccia, *The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis*. *Cell Death Differ*, 2008. **15**(4): p. 678-85.
447. Pugh, C.W. and P.J. Ratcliffe, *Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system*. *Nat Med*, 2003. **9**(6): p. 677-84.
448. Richard, D.E., E. Berra, and J. Pouyssegur, *Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1alpha in vascular smooth muscle cells*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(35): p. 26765-71.
449. Treins, C., et al., *Insulin stimulates hypoxia-inducible factor 1 through a phosphatidylinositol 3-kinase/target of rapamycin-dependent signaling pathway*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(31): p. 27975-81.
450. Manalo, D.J., et al., *Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1*. *Blood*, 2005. **105**(2): p. 659-69.
451. Halberg, N., et al., *Hypoxia-inducible factor 1alpha induces fibrosis and insulin resistance in white adipose tissue*. *Mol Cell Biol*, 2009. **29**(16): p. 4467-83.

BIBLIOGRAFIA

452. Alfranca, A., et al., *c-Jun and hypoxia-inducible factor 1 functionally cooperate in hypoxia-induced gene transcription*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(1): p. 12-22.
453. Cummins, E.P. and C.T. Taylor, *Hypoxia-responsive transcription factors*. Pflugers Arch, 2005. **450**(6): p. 363-71.
454. Zhou, S., et al., *Hypoxia inhibition of adipocytogenesis in human bone marrow stromal cells requires transforming growth factor-beta/Smad3 signaling*. J Biol Chem, 2005. **280**(24): p. 22688-96.
455. Samarina, J., et al., *FoxO proteins mediate hypoxic induction of connective tissue growth factor in endothelial cells*. J Biol Chem, 2010. **285**(7): p. 4328-36.
456. Yung, L.M., et al., *Reactive oxygen species in vascular wall*. Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets, 2006. **6**(1): p. 1-19.
457. Ushio-Fukai, M. and N. Urao, *Novel role of NADPH oxidase in angiogenesis and stem/progenitor cell function*. Antioxid Redox Signal, 2009. **11**(10): p. 2517-33.
458. Black, D., et al., *Transforming growth factor beta mediates hepatocyte apoptosis through Smad3 generation of reactive oxygen species*. Biochimie, 2007. **89**(12): p. 1464-73.
459. Borth, W., *Alpha 2-macroglobulin, a multifunctional binding protein with targeting characteristics*. FASEB J, 1992. **6**(15): p. 3345-53.
460. Bizik, J., et al., *Clonal variation in the production of tumor-associated alpha 2-macroglobulin in a malignant human melanoma and association with growth stimulation*. Cancer Res, 1989. **49**(4): p. 983-90.
461. Hovi, T., D. Mosher, and A. Vaheri, *Cultured human monocytes synthesize and secrete alpha2-macroglobulin*. J Exp Med, 1977. **145**(6): p. 1580-9.
462. Mosher, D.F. and D.A. Wing, *Synthesis and secretion of alpha2-macroglobulin by cultured human fibroblasts*. J Exp Med, 1976. **143**(2): p. 462-7.
463. Thal, D.R., R. Schober, and G. Birkenmeier, *The subunits of alpha2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein, native and transformed alpha2-macroglobulin and interleukin 6 in Alzheimer's disease*. Brain Res, 1997. **777**(1-2): p. 223-7.
464. Becker, C.G. and P.C. Harpel, *alpha2-Macroglobulin on human vascular endothelium*. J Exp Med, 1976. **144**(1): p. 1-9.
465. Sayegh, R.A., et al., *Endometrial alpha-2 macroglobulin; localization by in situ hybridization and effect on mouse embryo development in vitro*. J Clin Endocrinol Metab, 1997. **82**(12): p. 4189-95.
466. Zhang, Y., G. Ge, and D.S. Greenspan, *Inhibition of bone morphogenetic protein 1 by native and altered forms of alpha2-macroglobulin*. J Biol Chem, 2006. **281**(51): p. 39096-104.

467. Hopkins, D.R., S. Keles, and D.S. Greenspan, *The bone morphogenetic protein 1/Tolloid-like metalloproteinases*. *Matrix Biol*, 2007. **26**(7): p. 508-23.
468. O'Connor-McCourt, M.D. and L.M. Wakefield, *Latent transforming growth factor-beta in serum. A specific complex with alpha 2-macroglobulin*. *J Biol Chem*, 1987. **262**(29): p. 14090-9.
469. Cvirn, G., et al., *Alpha 2-macroglobulin enhances prothrombin activation and thrombin potential by inhibiting the anticoagulant protein C/protein S system in cord and adult plasma*. *Thromb Res*, 2002. **105**(5): p. 433-9.
470. Hoogendoorn, H., et al., *Alpha 2-macroglobulin binds and inhibits activated protein C*. *Blood*, 1991. **78**(9): p. 2283-90.
471. Schaller, J. and S.S. Gerber, *The plasmin-antiplasmin system: structural and functional aspects*. *Cell Mol Life Sci*, 2011. **68**(5): p. 785-801.
472. Brasselet, C., et al., *Collagen and elastin cross-linking: a mechanism of constrictive remodeling after arterial injury*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005. **289**(5): p. H2228-33.
473. Karnik, S.K., et al., *A critical role for elastin signaling in vascular morphogenesis and disease*. *Development*, 2003. **130**(2): p. 411-23.
474. Yamauchi, Y., et al., *Fibulin-4 and -5, but not Fibulin-2, are Associated with Tropoelastin Deposition in Elastin-Producing Cell Culture*. *Acta Histochem Cytochem*, 2010. **43**(6): p. 131-8.
475. Lee, M.J., et al., *Fibulin-5 promotes wound healing in vivo*. *J Am Coll Surg*, 2004. **199**(3): p. 403-10.
476. Soderberg, M.W., et al., *Gene expressions of small leucine-rich repeat proteoglycans and fibulin-5 are decreased in pelvic organ prolapse*. *Mol Hum Reprod*, 2009. **15**(4): p. 251-7.
477. Williamson, M.R., et al., *The role of endothelial cell attachment to elastic fibre molecules in the enhancement of monolayer formation and retention, and the inhibition of smooth muscle cell recruitment*. *Biomaterials*, 2007. **28**(35): p. 5307-18.
478. Hu, Q., et al., *Fibulin-5 mutations: mechanisms of impaired elastic fiber formation in recessive cutis laxa*. *Hum Mol Genet*, 2006. **15**(23): p. 3379-86.
479. Alvarez-Tejado, M., et al., *Hypoxia induces the activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt cell survival pathway in PC12 cells: protective role in apoptosis*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(25): p. 22368-74.
480. Avraamides, C.J., B. Garmy-Susini, and J.A. Varnier, *Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis*. *Nat Rev Cancer*, 2008. **8**(8): p. 604-17.
481. Rohwer, N., et al., *Hypoxia-inducible factor 1alpha mediates anoikis resistance via suppression of alpha5 integrin*. *Cancer Res*, 2008. **68**(24): p. 10113-20.
482. Ryu, M.H., et al., *Hypoxia-inducible factor-1alpha mediates oral squamous cell carcinoma invasion via upregulation of alpha5 integrin and fibronectin*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010. **393**(1): p. 11-5.

BIBLIOGRAFIA

483. Walton, H.L., et al., *Hypoxia induces differential expression of the integrin receptors alpha(vbeta3) and alpha(vbeta5) in cultured human endothelial cells*. J Cell Biochem, 2000. **78**(4): p. 674-80.
484. Zhou, S., et al., *Nogo-B mediates HeLa cell adhesion and motility through binding of Fibulin-5*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **398**(2): p. 247-53.
485. Sadek, M., et al., *Gene expression analysis of a porcine native abdominal aortic aneurysm model*. Surgery, 2008. **144**(2): p. 252-8.
486. Campa, J.S., R.M. Greenhalgh, and J.T. Powell, *Elastin degradation in abdominal aortic aneurysms*. Atherosclerosis, 1987. **65**(1-2): p. 13-21.
487. Tilson, M.D., *Histochemistry of aortic elastin in patients with nonspecific abdominal aortic aneurysmal disease*. Arch Surg, 1988. **123**(4): p. 503-5.
488. Mesh, C.L., et al., *Collagen and elastin gene expression in aortic aneurysms*. Surgery, 1992. **112**(2): p. 256-61; discussion 261-2.
489. Thompson, R.W. and W.C. Parks, *Role of matrix metalloproteinases in abdominal aortic aneurysms*. Ann N Y Acad Sci, 1996. **800**: p. 157-74.
490. Orbe, J., et al., *Independent association of matrix metalloproteinase-10, cardiovascular risk factors and subclinical atherosclerosis*. J Thromb Haemost, 2007. **5**(1): p. 91-7.
491. Ogata, T., et al., *Genetic analysis of polymorphisms in biologically relevant candidate genes in patients with abdominal aortic aneurysms*. J Vasc Surg, 2005. **41**(6): p. 1036-42.
492. Herranz, N., et al., *Lysyl Oxidase-like 2 Deaminates Lysine 4 in Histone H3*. Mol Cell, 2012. **46**(3): p. 369-76.
493. Lenk, G.M., et al., *Whole genome expression profiling reveals a significant role for immune function in human abdominal aortic aneurysms*. BMC Genomics, 2007. **8**: p. 237.
494. Wang, X., et al., *Decreased expression of fibulin-5 correlates with reduced elastin in thoracic aortic dissection*. Surgery, 2005. **138**(2): p. 352-9.
495. Wan, W., H. Yanagisawa, and R.L. Gleason, Jr., *Biomechanical and microstructural properties of common carotid arteries from fibulin-5 null mice*. Ann Biomed Eng, 2010. **38**(12): p. 3605-17.
496. McCormick, M.L., D. Gavrilu, and N.L. Weintraub, *Role of oxidative stress in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysms*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(3): p. 461-9.
497. Isenburg, J.C., et al., *Elastin stabilization for treatment of abdominal aortic aneurysms*. Circulation, 2007. **115**(13): p. 1729-37.

APÈNDIX 1

Medis, solucions i reactius

Medis de cultiu

HUVEC	Complet	Quiescència
M199 (Biological Industries)		
FBS (Biological Industries)	20%	10%
ECGS (Reactiva)	50µg/ml	
Heparina (Sigma-Aldrich)	50µg/ml	
L-Glutamina (Gibco BRL)	2 mM	2 mM
Penicil·lina (Gibco BRL)	100 U/ml	100 U/ml
Estreptomicina (Gibco BRL)	0,1 mg/ml	0,1 mg/ml

BAEC	Complet	Quiescència
RPMI 1640 (Gibco BRL)		
FBS (Biological Industries)	10%	1%
L-Glutamina (Gibco BRL)	2 mM	2 mM
Penicil·lina (Gibco BRL)	100 U/ml	100 U/ml
Estreptomicina (Gibco BRL)	0,1 mg/ml	0,1 mg/ml

MLEC	
DMEM:F12 (1:1) (Gibco BRL)	
FBS (Biological Industries)	20%
ECGS (BD Biosciences)	50 µg/ml
Heparina (Sigma-Aldrich)	50µg/ml
L-Glutamina (Gibco BRL)	2 mM
Penicil·lina (Gibco BRL)	100 U/ml
Estreptomicina (Gibco BRL)	0,1 mg/ml

CMLVm	
DMEM (Gibco BRL)	
FBS (Biological Industries)	20%
Penicil·lina (Gibco BRL)	100 U/ml
Estreptomicina (Gibco BRL)	0,1 mg/ml
Fungizona (Gibco BRL)	0,25 µg/ml

APÈNDIX 1

CMLV humanes

M199 (Gibco BRL)

FBS (Biological Industries) 20%

Sèrum humà 2%

L-Glutamina (Gibco BRL) 2 mM

Penicil·lina (Gibco BRL) 100 U/ml

Estreptomicina (Gibco BRL) 0,1 mg/ml

HeLa i HEK 293T

DMEM (Gibco BRL)

FBS (Biological Industries) 10%

L-Glutamina (Gibco BRL) 2 mM

Penicil·lina (Gibco BRL) 100 U/ml

Estreptomicina (Gibco BRL) 0,1 mg/ml

HEK 293T

DMEM (Gibco BRL)

FBS (Biological Industries) 10%

L-Glutamina (Gibco BRL) 2 mM

Penicil·lina (Gibco BRL) 100 U/ml

Estreptomicina (Gibco BRL) 0,1 mg/ml

Inhibidors

agent	efecte	concentració
DPI	inhibeix flavoenzims	5 μ M
rotenona	inhibeix el transport d'electrons mitocondrial	2 μ M
catalasa	degradació de H ₂ O ₂	3000 U/ml
apocinina	inhibeix la NADPH oxidasa	100 μ M

Preparació de bacteris competents

Solució RF1 (pH 5,8)		Solució RF2	
KCl	100 mM	MOPS	10 mM
MnCl ₂	50 mM	KCl	10 mM
KA	30 mM	CaCl ₂	75 mM
CaCl ₂	10 mM	Glicerol	15%
Glicerol	15%		

Tampons de lisi

TAMPÓ DE LISI PER A EXTRACTES PROTEICS CEL·LULARS	
Tris-HCl (pH 7,4)	10 mM
SDS	1%
Ortovanadat	1 mM

TAMPÓ DE LISI PER A EXTRACTES PROTEICS DE TEIXITS	
EGTA	0,5 mM
NaCl	100 mM
Glicerol-2-fosfat	100 mM
HEPES	50 mM
Glicerol	10%
TWEEN 20	0,1%
Inhibidor de proteases (Roche)	1x
DTT	1 mM

ChIP

TAMPÓ DE DILUCIÓ DE L'INPUT	
Tris-HCl 1M pH 8,8	16,7 mM
SDS 10%	0,01%
Triton® X-100 al 10%	1,1%
EDTA 500 mM	1,2 mM
NaCl 5 M	90 mM

APÈNDIX 1

Immunohistoquímica

SOLUCIÓ DE BOUIN

Solució saturada d'àcid pícric	75 ml
Àcid acètic	5 ml
Paraformaldehid al 40%	25 ml

ALCOHOL ÀCID A L'1%

Etanol al 70%	99 ml
HCl concentrat	1 ml

Anticossos

ANTICOSSOS dirigits contra	referència	casa	usos
Akt	9272	Cell Signaling	WB
Akt fosforilada	9271	Cell Signaling	WB
ERK1/2	9102	Cell Signaling	WB
ERK1/2 fosforilat	9106	Cell Signaling	WB
LOX	ab31238	Abcam	WB, IC
HIF-1 α	ab16066	Abcam	EMSA
HIF-1 α	NB100-449A	Novus	WB
HIF-2 α	ab199	Abcam	WB
FBLN5	ab66339	Abcam	WB, IHC
FBLN5	ab36611	Abcam	IC
FBLN5	sc30170	Santa Cruz	WB

WB, *Western blot*; IC, immunocitoquímica; IHC, immunohistoquímica.

siRNA

dirigits contra	referència	casa
FBLN5	L-017621-00	Dharmacon
HIF-1 α	42840	Ambion
HIF-2 α	s4699	Ambion
inespecífic	SilencerTM Negative Control no. 1	Ambion
inespecífic	ON-TARGETplus siCONTROL D-001810-10	Dharmacon

Anàlisi per PCR en temps real

Anàlisi per PCR en temps real amb *SYBR-Green*

EPOm sentit	5'-GATGGGGGTGCCCCGAACGTC-3'
EPOm antisentit	5'-GTCGCAGATGAGGCGTGGGG-3'

Sondes *Taqman*TM específiques *Assay-on-Demand*TM (Applied Biosystems)

A2M	humà	Hs00163474_m1	
ARNr 18S		4319413E	
BMP-1	humà	Hs00241807_m1	
β-actina	humà	Hs99999903_m1	
COL-1α	humà	Hs00164004_m1	
ELN	humà	Hs00355783_m1	
FBLN2	humà	Hs00157482_m1	
FBLN3	humà	Hs00244575_m1	
FBLN5	humà	Hs00197064_m1	
HIF-1α	humà	Hs00244575_m1	
HIF-2α	humà	Hs01026149_m1	
LOX	humà	Hs00184700_m1	
LOX	rata	Rn01491829_m1	sonda utilitzada per a les BAEC
LOX	ratolí	Mm00495386_m1	
LOXL1	humà	Hs00173746_m1	
LOXL2	humà	Hs00158757_m1	
LOXL2	ratolí	Mm00804740_m1	
LOXL3	humà	Hs00261671_m1	
LOXL4	humà	Hs00260059_m1	
MMP-2	humà	Hs00234422_m1	
MMP-9	humà	Hs00234579_m1	
MMP-10	humà	Hs00233987_m1	
TBP	humà	Hs99999910_m1	
TBP	ratolí	Mm00446973_m1	
VEGF-A	humà	Hs00173626_m1	

APÈNDIX 2

Publicacions

Hypoxia-induced ROS signaling is required for LOX up-regulation in endothelial cells

Anna Guadall¹, Mar Orriols¹, Javier F. Alcudia¹, Victoria Cachafeiro², Jose Martinez-Gonzalez¹, Cristina Rodriguez¹

¹Centro de Investigacion Cardiovascular (CSIC-ICCC), Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, c/ Antoni M^a Claret 167, 08025 Barcelona, Spain. ²Departamento de Fisiologia, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Avda. de la Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain

TABLE OF CONTENTS

1. Abstract
2. Introduction
3. Materials and methods
 - 3.1. Cell culture
 - 3.2. Real-time PCR
 - 3.3. Immunostaining and confocal microscopy
 - 3.4. Lysyl oxidase activity
 - 3.5. Constructs of LOX promoter
 - 3.6. Transient transfections and luciferase assays
 - 3.7. HIF-1alpha siRNA transfection
 - 3.8. Western blot analysis
 - 3.9. Statistical analysis
4. Results
 - 4.1. Hypoxia induces LOX expression in endothelial cells
 - 4.2. The up-regulation of LOX by hypoxia is independent of autocrine factors
 - 4.3. Hypoxia increases LOX transcriptional activity in endothelial cells
 - 4.4. Rapamycin partially prevented the induction of LOX by hypoxia
 - 4.5. HIF-1alpha inhibition partially abrogated hypoxia-induced LOX up-regulation
 - 4.6. ROS signaling is involved in hypoxia-induced LOX up-regulation
 - 4.7. Smad pathway is involved in the increase of LOX transcriptional activity induced by hypoxia
5. Discussion
6. Acknowledgment
7. References

1. ABSTRACT

The adaptive response of endothelial cells to hypoxia involves a substantial remodeling of extracellular matrix (ECM). In endothelial cells hypoxia up-regulates lysyl oxidase (LOX), a key enzyme in ECM assembly, relevant to vascular homeostasis. However, the mechanism underlying this response has not been established. Hypoxia up-regulated LOX expression in endothelial cells (HUVEC and BAEC) and concomitantly increased LOX enzymatic activity. This effect was independent of autocrine factors released by hypoxic cells and relies on a transcriptional mechanism. Both mTOR blockade and HIF-1alpha knockdown slightly prevented LOX up-regulation by hypoxia, suggesting that HIF-1alpha is only partially responsible for this effect. In fact, serial promoter deletion and mutagenesis studies indicated a limited contribution of the previously described hypoxia response element (-75 bp). Interestingly, Smad over-expression further increased LOX transcriptional activity in endothelial cells exposed to hypoxia. Moreover, the increase in LOX expression triggered by hypoxia was significantly reduced by reactive oxygen species (ROS) inhibitors. Thus, our data support a role of Smad signaling and ROS in the up-regulation of LOX by hypoxia in endothelial cells.

2. INTRODUCTION

Hypoxia is associated with pathological conditions such as cancer, ischemic disorders, chronic inflammation and atherosclerosis. The decrease in oxygen tension alters vascular function and affects endothelial cell physiology triggering and adaptive response that promotes cell survival and angiogenesis, modulates cell metabolism, and involves extracellular matrix (ECM) remodeling (1-3). This latter process entails changes in the composition, posttranslational modification, assembly and deposition of the ECM, which affect not only its structure and mechanical properties but also modify growth factor availability and thereby severely disturb cell homeostasis (3).

The hypoxia-inducible factor (HIF) 1 is the master regulator of oxygen homeostasis. HIF-1 is a heterodimeric transcription factor composed of a constitutively expressed beta-subunit (known as aryl hydrocarbon-receptor nuclear translocator [ARNT or HIF-1beta]) and an oxygen-regulated alpha subunit (2). The molecular mechanism underlying oxygen sensing is not entirely understood, but recent advances support the role of reactive oxygen species (ROS) in hypoxia signaling (4-6).

ROS-mediated modulation of LOX by hypoxia

Lysyl oxidase (LOX) plays a pivotal role in ECM scaffolding. LOX is an extracellular copper enzyme that initiates the covalent cross-linking of collagen and elastin allowing normal ECM assembly (7,8). There is growing evidence that LOX plays a relevant role in vascular homeostasis. This enzyme assures vascular wall integrity, and participates in endothelial dysfunction triggered by atherosclerotic risk factors such as hypercholesterolemia, hyperhomocysteinemia and proinflammatory cytokines (9-12). LOX expression is highly up-regulated in tumor cells exposed to hypoxic stress (13) and, although high-throughput screenings have demonstrated that hypoxia enhances endothelial LOX expression (14), the molecular mechanisms that underlie the hypoxic up-regulation of this enzyme in endothelial cells have not been well-characterized. This study aims to clarify the mechanisms involved in LOX regulation by hypoxia in endothelial cells.

3. MATERIALS AND METHODS

3.1. Cell culture

Bovine aortic endothelial cells (BAEC; Clonetics) were cultured in RPMI, supplemented with 10% FCS (Biological Industries), antibiotics (0.1 mg/mL streptomycin, 100 U/mL penicillin G) and 2 mM L-glutamine as previously described (10). Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), kindly provided by Dra M Camacho (Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona) were obtained by collagenase digestion and were cultured in medium M199 supplemented with 20 mM HEPES, pH 7.4, 30 µg/mL endothelial growth factor supplement, 100 µg/mL heparin, 20% FCS and antibiotics (15). Mouse lung endothelial cells (MLEC) were isolated from lungs of C57BL/6 mice by collagenase A (Roche) digestion followed by selection with intercellular adhesion molecule 2 (ICAM-2) coated magnetic beads (Invitrogen) as previously described (15). Endothelial cells were used between third and fifth passage. Cells were maintained in standard culture conditions (21% O₂, 5% CO₂, 95% humidity) until 80% confluent. Hypoxic exposure was carried out under 1% O₂, 5% CO₂ (balanced with N₂) for the times indicated (Whitley H35 hypoxystation). The mTOR (mammalian target of rapamycin) inhibitor, rapamycin (100 nM; Sigma), the inhibitor of mitochondrial electron transport, rotenone (2 µM), DPI, an inhibitor of flavoenzymes (5 µM), catalase (3000 U/mL) and apocynin a NADPH oxidase inhibitor that behaves as a ROS scavenger in vascular cells (16) (100 µM) were added 1 h before hypoxia exposure. In some experiments the effect of recombinant human VEGF (vascular endothelial growth factor)-A (50 ng/mL; R&D Systems) was assessed. No cytotoxicity, analyzed by the trypan blue exclusion test and the XTT based assay for cell viability (Roche), was observed after the treatment with either of these compounds.

3.2. Real-time PCR

Total RNA was isolated using UltraspecTM (Biotech) following manufacturer's instructions. RNA (1 µg) was reverse transcribed into cDNA using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied

Biosystems) in the presence of random hexamers. Quantification of mRNA levels was performed by Real-time PCR using an ABIPRISM 7000 sequence detection system (Applied Biosystems) and specific primers and probes provided by the Assay-on-Demand system for LOX (Hs00184700_m1 for HUVEC and Rn01491829_m1 for BAEC) and VEGF-A (Hs00173626_m1). TATA-binding protein (TBP) was used as an endogenous control (Hs99999910_m1) (17). The efficiency of PCR reactions was 90-100% based on the slope of calibration curves (slope between -3.6 and -3.1).

3.3. Immunostaining and confocal microscopy

Endothelial cells were plated at a density of 2 x 10⁴ cells onto 12 mm diameter glass-bottom dishes (Willco Wells B.V.) coated with gelatin. Cells were maintained in normoxia or exposed to hypoxia as described above. Afterwards, cells were fixed with 4% paraformaldehyde, permeabilized with 0.1% Tween-20 and incubated with a rabbit polyclonal antibody against LOX (Abcam Ref: ab31238; 1:100) for 1 h. Then cells were washed and incubated for 1 h with a fluorescence-conjugated secondary antibody (goat anti-rabbit Alexa Fluor 488; Molecular Probes). Nuclei and actin fibers were stained with Hoeschst 33342 and Alexa Fluor 633-phalloidin respectively (Molecular Probes).

3.4. Lysyl oxidase activity

LOX activity was measured by a high sensitive fluorescent assay as previously described (9). Briefly, endothelial cells were seeded in a six-well plate (10⁷ cells/well), and after 48 h media was replaced by phenol red-free M199 (Gibco) depleted of serum, antibiotics and glutamine. Then cells were maintained under normoxia or exposed to hypoxia for the indicated times. LOX activity was measured in cell supernatants. An aliquot of the media (200 µL) was incubated in the presence and absence of 500 µmol/L beta-aminopropionitrile (BAPN) at 37°C for 30 min with 1 U/mL of horseradish peroxidase, 10 µM Amplex red (Molecular Probes) and 10 mM 1,5-diaminopentane in 1.2 M urea, 0.05 M sodium borate pH 8.2. The reaction was stopped on ice and differences in fluorescence intensity (excitation wavelength: 563 nm; emission wavelength: 587 nm) between samples with and without BAPN were determined.

3.5. Constructs of LOX promoter

The luciferase reporter vector containing 821 bp of LOX promoter (from -821 to + 83 related to the first translation start codon ATG) was amplified by PCR and cloned into the pGL3 basic luciferase reporter vector (Promega) using the *KpnI-HindIII* restriction sites as previously described (pLOX-821) (10). Two serial deletion constructs (-631 to + 83 and -405 to +83) were generated by PCR amplification (pLOX-631 and pLOX-405 respectively). The hypoxia response element (HRE) site located at position -75 (13) was mutated using the Quick-Change II Site-directed Mutagenesis Kit (Stratagene) according to the manufacturer's instructions (18). The HRE mutation was introduced with primers: 5'-GGTTGAAGATTTCTCCTTCCTCCTTGGATTGAGCC

ROS-mediated modulation of LOX by hypoxia

CCG-3' and 5'-CGGGGCTCAAATCA~~aaa~~GAGGGAAGGAGAAATCTTCAACC-3' (putative sites are underlined and changes are indicated in lower case letters). The pLOX-821 vector was used as a template. The HRE mutation introduced by this strategy is identical to that described by Erler et al (13) and does not generate any novel element as derived from *in silico* analysis (MatInspector software; Genomatix). Mutations were confirmed by DNA sequencing.

3.6. Transient transfections and Luciferase assays

Transient transfections of BAEC were performed with LipofectinTM (Invitrogen) and the pLOX luciferase constructs described above together with the pSVbeta-gal (Promega), as previously reported (11). Briefly, transfections were carried out with 1 µg/well of the pLOX luciferase construct, 0.3 µg/well of pSVbeta-gal and 3 µl of Lipofectin. In co-transfection experiments expression vectors for Smad2, Smad3 or Smad4 (19) (provided by Dr J Yanagisawa, University of Tsukuba, Japan) were used together with the corresponding empty vector. The complexes DNA/liposome were added to the cells for 7 h. After 24 h, transfected cells were exposed to hypoxia for 18 h. Luciferase activity was measured in cell lysates using the Luciferase assay kit (Promega) and a luminometer (Orion I, Berthold detection systems) according to the manufacturer. Results were normalized by beta-galactosidase activity using the Enzyme Assay SystemTM (Promega). Beta-galactosidase activity was not significantly modified by hypoxia exposure.

3.7. HIF-1alpha siRNA transfection

HUVEC were transfected with a HIF-1alpha Silencer pre-designed siRNA (ID# 42840; Ambion) or a SilencerTM Negative Control# using an Amaxa NucleofectorTM and the HUVEC Nucleofector kit according to the manufacturer's instructions (Amaxa) as previously described (20). Electroporation was carried out with 1 x 10⁶ cells and 1 µg of siRNA with program U-001. After electroporation cells were resuspended in 500 µL of pre-warmed cell culture medium, seeded in 6-well plates (350.000 cells/well) for 24 h and then subjected to hypoxic or normoxic conditions. HIF-1alpha knockdown was verified by Western-blot.

3.8. Western blot analysis

Whole cell protein extracts were resolved by SDS-PAGE and transferred to nitro-cellulose filters (Bio-Rad). Blots were incubated with an antibody directed against HIF-1alpha (NB100-449A, Novus; 1:500). Bound antibody was detected after incubation with a HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG and using the SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Pierce). Equal loading of protein in each lane was verified by Ponceau staining and by beta-actin signal (21).

3.9. Statistical analysis

Data are expressed as mean±SEM. Means were compared by one-factor ANOVA followed by Fisher PLSD to assess specific group differences. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

4. RESULTS

4.1. Hypoxia induces LOX expression in endothelial cells

To determine whether hypoxia induces LOX expression in endothelial cells, HUVEC, BAEC and MLEC were incubated under hypoxic conditions (1% O₂) up to 24 h. As previously described, in our culture conditions hypoxia significantly induced HIF-1alpha protein levels (data not shown) (18). A similar temporal pattern of LOX up-regulation was observed in HUVEC and BAEC exposed to hypoxia (Figure 1A). LOX mRNA levels reached a maximum after 18 h of hypoxia (3-fold over controls). This response was also observed in MLEC (data not shown). The induction of LOX expression in both HUVEC and BAEC was confirmed in immunohistochemical studies. As shown in Figure 1B, hypoxia enhanced intracellular LOX immunostaining. Furthermore, LOX activity significantly increased in cell supernatants from cells exposed to hypoxia (control: 100±3.3 vs hypoxia 48 h: 145±13.8; $p < 0.05$).

4.2. The up-regulation of LOX by hypoxia is independent of autocrine factors

Hypoxia is a potent inducer of growth factor secretion in vascular endothelial cells. For this reason, we analyzed whether autocrine factors released by cells exposed to hypoxia mediate LOX up-regulation. Under our culture conditions hypoxia strongly increased VEGF expression (Figure 2A); however, stimulation of endothelial cells with VEGF (50 ng/mL) did not modify LOX mRNA levels (Figure 2B). Furthermore, HUVEC cultured with conditioned media from hypoxic endothelial cells did not show changes on LOX expression (Figure 2C). Thus, we exclude autocrine factors released by endothelial cells in response to hypoxia as responsible for the up-regulation of LOX.

4.3. Hypoxia increases LOX transcriptional activity in endothelial cells

Next we aimed to establish whether hypoxia could modulate LOX transcriptional activity in endothelial cells. Pretreatment of BAEC with 5,6-dichloro-beta-D ribofuranosyl benzimidazole (DRB), a transcriptional inhibitor, completely prevented the increase in LOX mRNA levels elicited by hypoxia (Figure 3A). In agreement, transient transfection studies revealed that hypoxia induces LOX transcriptional activity about 2-fold (Figure 3B).

4.4. Rapamycin partially prevented the induction of LOX by hypoxia

The mTOR pathway is a positive regulator of HIF-1alpha (22). To characterize the role of this pathway in the induction of LOX by hypoxia, we analyzed the effect of rapamycin (a mTOR inhibitor) on both HIF-1alpha protein and LOX mRNA levels. Western blot analysis confirmed that rapamycin prevented the induction of HIF-1alpha protein levels caused by hypoxia (Figure 4A). However, the increase in LOX mRNA levels observed in hypoxic cells was only partially blocked by rapamycin (Figure 4B).

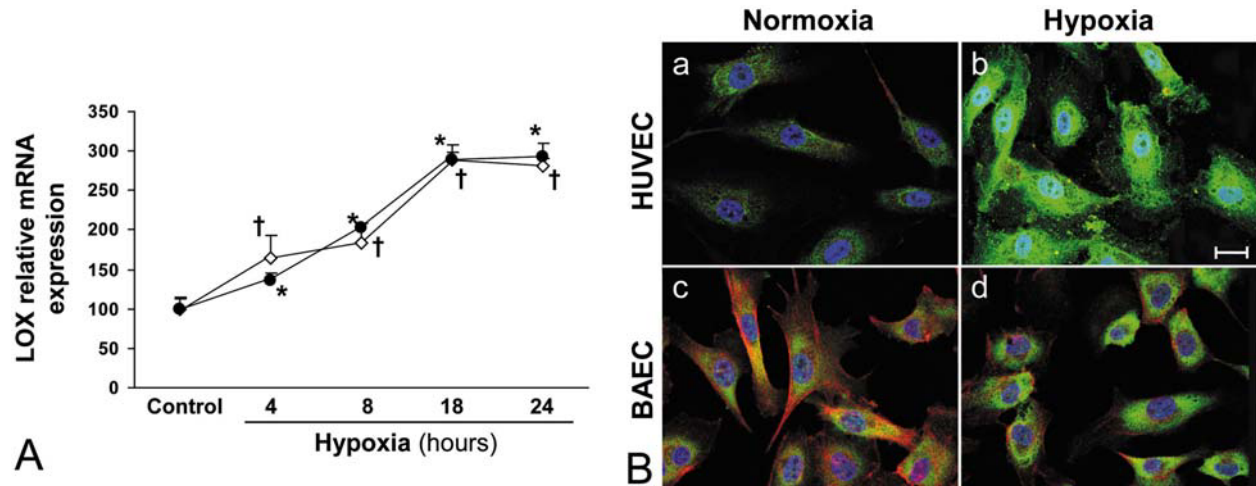


Figure 1. Hypoxia increases LOX expression in endothelial cells. (A) HUVEC (filled circles) or BAEC (empty diamonds) were maintained under normoxic conditions (21% O₂) or exposed to hypoxia (1% O₂) during different times and LOX mRNA levels were evaluated by real-time PCR. Data were normalized by TBP. Results are expressed as mean ± SEM (n=9; p<0.05: *, vs. control HUVEC [normoxia]; †, vs. control BAEC [normoxia]). (B) HUVEC and BAEC were maintained under normoxia or exposed to hypoxia for 48 h and LOX was analyzed by immunocytochemistry. LOX staining is shown in green. Cells were counterstained with Hoescht to highlight nuclei (blue) and with an Alexa Fluor 633-phalloidin antibody to visualize F-actin (red). Bar: 20 μm.

4.5. HIF-1alpha inhibition partially abrogated hypoxia-induced LOX up-regulation

To further evaluate the contribution of HIF-1alpha in LOX regulation, knockdown experiments using siRNA targeting HIF-1alpha were conducted in HUVEC. HIF-1alpha-siRNA suppressed the increase on HIF-1alpha protein levels triggered by hypoxia (Figure 5A) and strongly reduced HIF-1alpha mRNA levels (to a 32.42%; p<0.001). The up-regulation of LOX induced by hypoxia was only partially prevented by HIF-1alpha silencing (Figure 5B). Therefore, data from figures 3 and 4 indicate that HIF-1alpha is only partially responsible for the hypoxia-induced up-regulation of LOX in endothelial cells and suggest that other mechanisms should be involved in this process.

4.6. ROS signaling is involved in hypoxia-induced LOX up-regulation

It has been recently demonstrated that ROS play a critical role in hypoxia signaling (4,5,23). In this context, we aimed to characterize the role of hypoxia-induced ROS generation on LOX expression using a pharmacological approach. As shown in Figure 6 the increase of LOX mRNA levels elicited by hypoxia in HUVEC was significantly reduced by DPI, rotenone, catalase and apocynin supporting that ROS signaling is involved in LOX up-regulation by hypoxia in endothelial cells.

4.7. Smad pathway is involved in the increase of LOX transcriptional activity induced by hypoxia

To more accurately establish the contribution of HIF-1alpha to the hypoxic up-regulation of LOX in endothelial cells, site-directed mutagenesis targeting a previously reported HRE located at -75 bp in LOX promoter (HRE/-75) (13) was carried out. As observed in

Figure 7A, when HRE/-75 was mutated basal activity of LOX promoter decreased but this strategy only partially reduced hypoxia responsiveness. In fact, hypoxia was still able to significantly increase LOX promoter activity. By serial deletion studies we determined that a promoter region located between positions -821 to -405 is involved in hypoxia-induced LOX up-regulation (Figure 7B). By *in silico* analysis we did not identify any putative HRE in this region, but it contains several putative Smad binding elements (SBEs). Because signaling via Smad proteins mediates hypoxic responses in endothelial cells (24) we analyze their ability to modulate LOX transcriptional activity. Smad2 and/or Smad3 were co-transfected in BAEC with Smad4 under normoxia or hypoxia. Smad over-expression elicited a further increase in pLOX-834 activity in BAEC exposed to hypoxia, while it had not significant consequences on LOX promoter activity in normoxic conditions (Figure 8). These data support a contribution of Smad signaling on LOX up-regulation by hypoxia.

5. DISCUSSION

We have previously demonstrated that LOX, a key enzyme for the maintenance of ECM stability, regulate endothelial cell function and seems to play a key role in vascular homeostasis (9,10,12,25,26). In fact, LOX is strongly expressed in the endothelium of healthy coronary arteries (12), suggesting that this cell monolayer significantly contributes to vascular LOX activity, although the relative contribution of endothelial cells *versus* vascular smooth muscle cells (VSMC) has not been analyzed. Interestingly, disturbed LOX activity has been associated with cardiovascular diseases as well as with tumor progression (26-28) pathologies in which hypoxia is a

ROS-mediated modulation of LOX by hypoxia

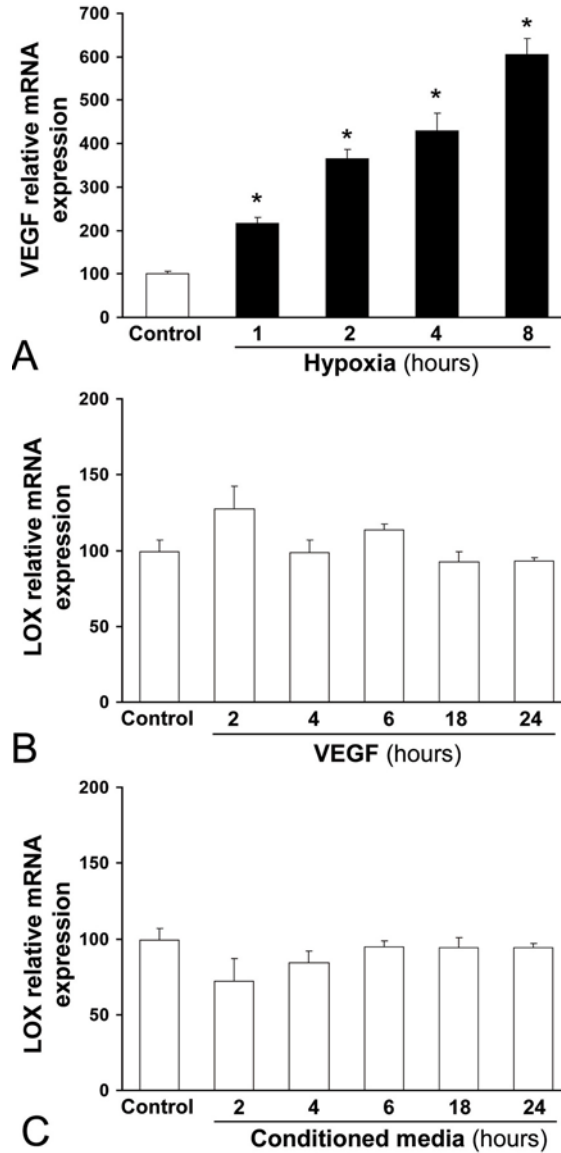


Figure 2. The increase in LOX expression elicited by hypoxia is not mediated by autocrine mechanisms. (A) HUVEC were maintained under normoxic conditions or exposed to hypoxia during the times indicated and VEGF mRNA levels were analyzed. (B) LOX mRNA levels were evaluated in HUVEC cells stimulated with VEGF (50 ng/mL) during different times. (C) LOX mRNA levels from HUVEC stimulated during the times indicated with conditioned media from cells maintained under normoxia or hypoxia for 18 h. Data are expressed as mean \pm SEM, (n=9; $p < 0.05$; *, vs. control cells).

common environmental factor that promotes vascular remodeling and triggers a metastatic phenotype respectively (29-32). HIF-1 is the master regulator of hypoxic responses (1,2). HIF-1 could also be activated in an oxygen-independent manner by hormones and growth factors further contributing to the control of vascular function (33, 34). Among many other effects HIF-1 modulates the expression of ECM proteins in endothelial cells (14). Furthermore, HIF-1 controls epithelial-mesenchymal transition and fibrogenesis (35), at least in part, through the regulation of LOX and LOX-like 2 (LOXL2), both identified as hypoxia targets in tumor cells (13,36). In the present study we demonstrated that both

HIF-1-dependent and independent mechanisms underlie the induction of LOX expression by hypoxia in endothelial cells and that ROS participate in the signaling pathways involved in such effect.

Our data show that hypoxia increases LOX mRNA levels in endothelial cells as it has been previously demonstrated by high-throughput microarray approaches (14). It should be noted that the increase in LOX expression induced by hypoxia in endothelial cells (3-fold) is markedly lower than that reported in breast cancer cells (120-fold) or in Hep3B cells (13-fold) (36,37), suggesting that hypoxia regulates LOX

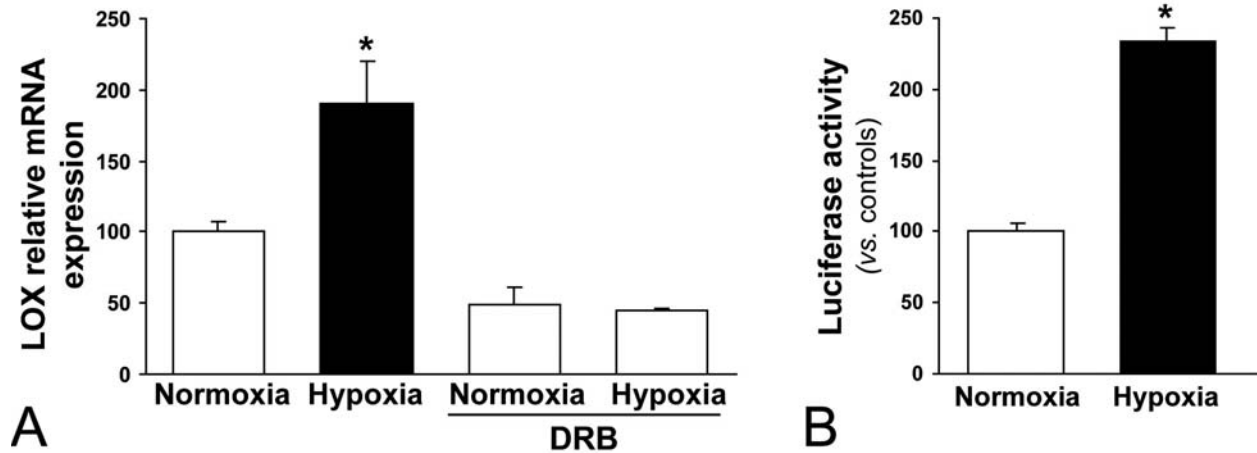


Figure 3. Hypoxia up-regulates LOX transcriptional activity. (A) LOX mRNA levels were evaluated in BAEC exposed to normoxic or hypoxic conditions for 24 h in the presence or in the absence of a transcriptional inhibitor (50 μ M DRB). (B) BAEC transfected with the pLOX-834 luciferase construct were exposed to normoxic or hypoxic conditions for 18 h. Luciferase and β -galactosidase activities were determined as described in Methods. Data are expressed as mean \pm SEM. (n=9; $p < 0.05$: *, vs. control cells [normoxia]).

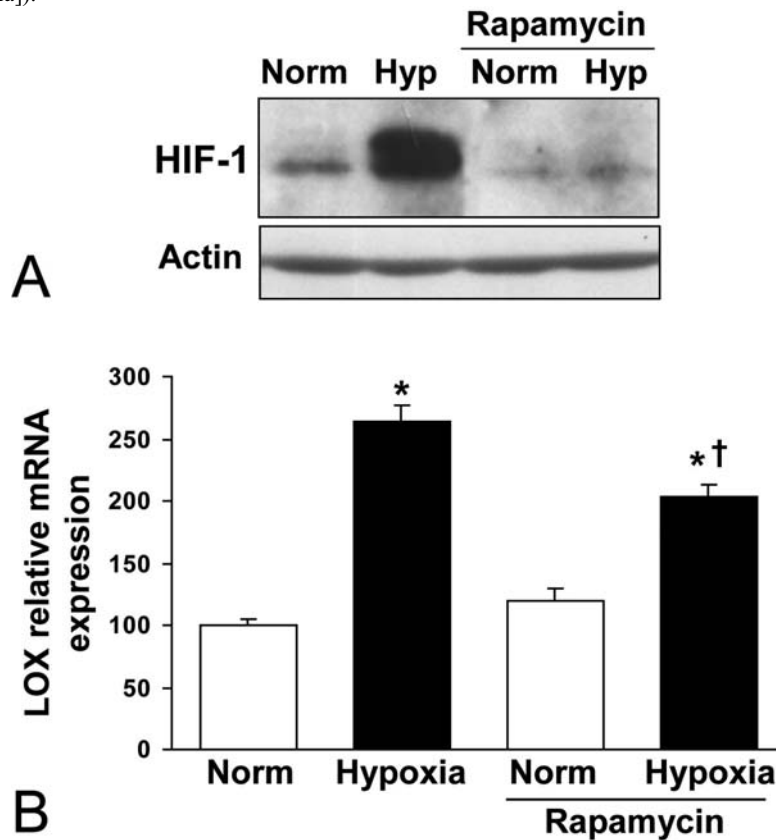


Figure 4. The mTOR pathway is only partially involved in the up-regulation of LOX by hypoxia in endothelial cells. BAEC were preincubated with rapamycin (100 nM) and exposed to normoxia (Norm, controls) or hypoxia (Hyp, 24 h). (A) HIF-1alpha (HIF-1) protein levels were analyzed by Western-blot. Beta-actin (actin) levels were used as a loading control. A representative autoradiogram of three independent experiments performed by duplicate is shown. (B) LOX mRNA levels were determined in these cells. Data are expressed as mean \pm SEM (n=9; $p < 0.05$: *, vs. control cells [normoxia]; †, vs. cells exposed to hypoxia in the absence of rapamycin).

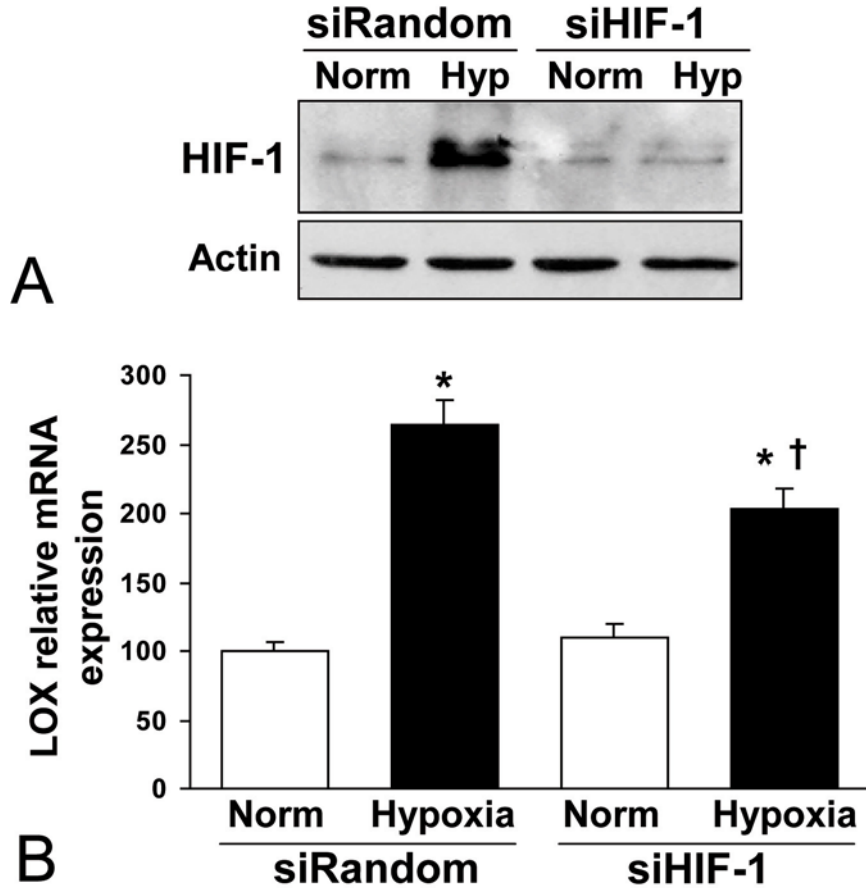


Figure 5. HIF-1alpha silencing partially abrogates hypoxia-induced LOX up-regulation in HUVEC. HUVEC were transfected with a HIF-1alpha specific siRNA (siHIF-1) or a control siRNA (siRandom) and exposed to normoxia or hypoxia during 24 h. (A) Western blot assays confirm the blockade of HIF-1alpha (HIF-1) protein levels by siHIF-1. Beta-actin (actin) levels were used as a loading control. (B) HIF-1alpha silencing slightly prevents the up-regulation of LOX mRNA levels. Results are expressed as mean \pm SEM (n=9; $p < 0.05$: *, vs. normoxic cells transfected with the same siRNA; †, vs. hypoxic cells transfected with siRandom).

expression in a cell-type specific manner. In fact, under respiratory hypoxia LOX is up-regulated in white adipose tissue, whereas its expression decreases in other tissues such as muscle (38). Interestingly, the up-regulation of LOX mRNA levels was associated to an increase in both LOX protein levels (analyzed by immunocytochemistry) and activity (evaluated in cell supernatants). In previous studies Postovit *et al.* (37) also reported a marked increase in mature LOX protein levels in tumor cells exposed to hypoxia, but their approach only detected significant changes in LOX activity after cell re-oxygenation, because LOX catalytic activity requires molecular oxygen.

We have shown that in endothelial cells the increase in LOX expression triggered by hypoxia relies on a transcriptional mechanism and seems to be independent of the autocrine secretion of factors such as VEGF. Cell response to hypoxia is mediated by a network of transcription factors (18,39,40), but particularly by HIF-1 (1,2). It has been suggested that

besides HIF-1 other transcription factors could participate in the transcriptional up-regulation of LOX under hypoxia, although these factors have not been identified (37). Accordingly, HIF-1alpha silencing or inhibition of the mTOR axis in endothelial cells only slightly prevented LOX up-regulation by hypoxia. In this regard, recent findings indicate that in several tumor cells Notch signaling promotes an increase in HIF-1alpha recruitment to LOX promoter and thereby enhances hypoxia-induced activation of LOX transcription (41). Whether the low up-regulation of LOX in endothelial cells as compared to other cell types is due to a defective interaction between Notch and HIF-1alpha in these cells is currently unknown, however, our data support the participation of other transcriptional mechanisms. In fact, by site-directed mutagenesis we show that the previously reported HRE responsible for hypoxia-dependent LOX up-regulation in tumor cells (HRE/-75) is only responsible for a part of the observed effect. Furthermore, by serial deletion studies we located a hypoxia-responsiveness region between 821 to 405 bp

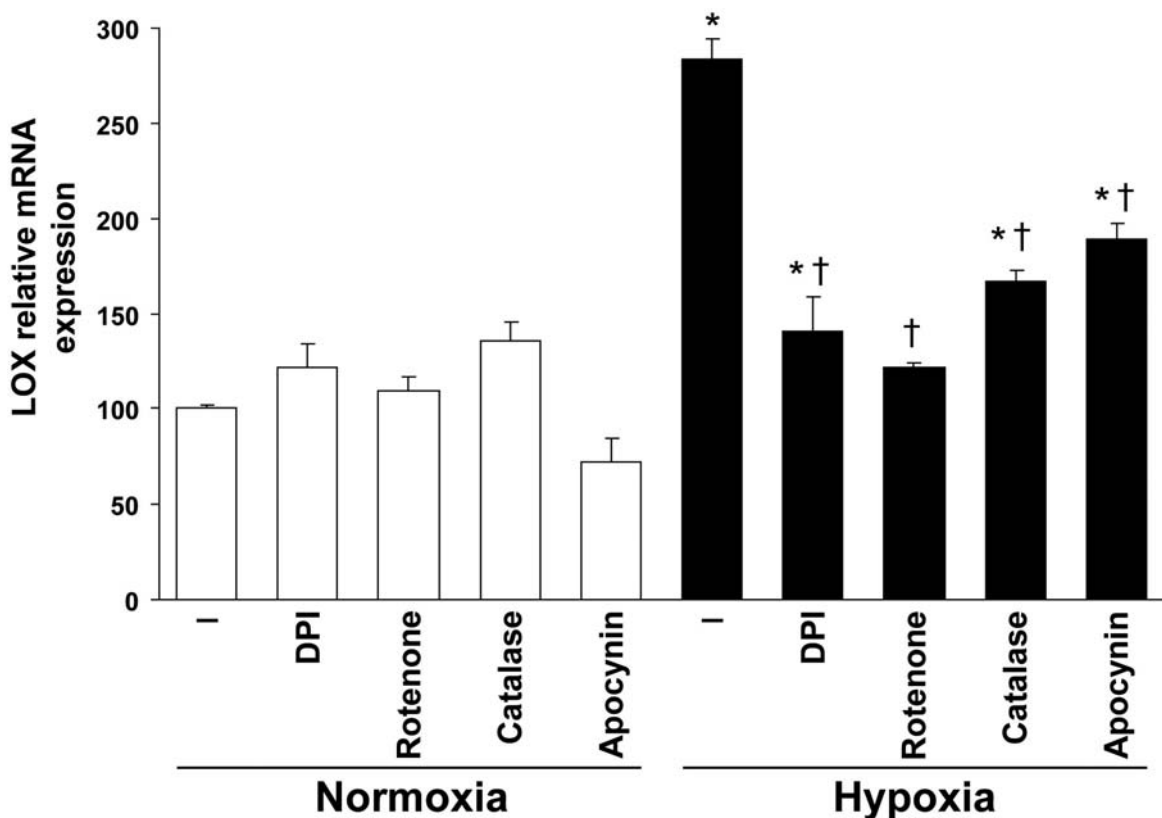


Figure 6. ROS signaling is involved in the up-regulation of LOX by hypoxia in endothelial cells. LOX expression was determined in HUVEC pre-incubated with inhibitors of oxidative stress maintained in normoxia or exposed to hypoxia for 24 h (DPI; 5 μ M; Rotenone, 2 μ M; Catalase, 3000 U/mL; Apocynin, 100 μ M). Data are expressed as mean \pm SEM (n=9; p <0.05: *, vs. control cells; †, vs. hypoxic cells).

upstream the transcription start site. In this context, we focused our attention on other transcription factors, specifically in Smad signaling that in endothelial cells participates in cellular responses to hypoxia. Smads are activated by hypoxia in different cell types including HUVEC (24,42,43) and a cooperation between Smad and HIF-1 α signaling has been extensively reported (44,45). Furthermore, Smads also interact with other transcription factors such as FoxO proteins regulating endothelial cell responses to hypoxia (46). In this context, we have observed that Smad2/3/4 over-expression elicited a further increase in LOX promoter activity in endothelial cells exposed to hypoxia, while baseline LOX transcriptional activity was unaffected by Smad co-transfection under normoxic conditions. This behavior is similar to the Smad-dependent up-regulation of TGF (transforming growth factor) β -2 by hypoxia reported in HUVEC (24). The mechanism underlying hypoxia-dependent Smad activation is unclear. It has been related with an autocrine process in which bioactivation of TGF β -2 by hypoxia results in the induction of the TGF β /Smad axis. As we have indicated above, however, our data ruled out the involvement of autocrine factors. Therefore, since hypoxia activates multiple intracellular kinases able to promote Smad activation by phosphorylation, a

TGF β R-independent mechanism could not be ruled out.

ROS signaling controls several aspects of the pathophysiology of the vascular wall. ROS alter vascular function and contribute to vascular remodeling and ECM reorganization associated to cardiovascular diseases such as atherosclerosis or hypertension (47). Although the induction of oxidative stress under hypoxia has been surrounded by some controversy, it has been demonstrated that acute exposure to hypoxia results in a sudden increase in ROS generation by mitochondrial complex III. In fact, mitochondrial ROS are required for hypoxia-dependent HIF-1 α stabilization, probably by direct inhibition of prolyl hydroxylases that target HIF-1 α for ubiquitination and proteasomal degradation (4,5,23); thus ROS seem to be the initial stimulus that triggers HIF-1 α -dependent responses under hypoxia. Interestingly, our experiments in the presence of oxidative stress inhibitors evidenced the relevance of ROS signaling in LOX up-regulation by hypoxia. This result is somewhat unexpected given that ROS seem to be essential for HIF-1 α up-regulation but HIF-1 α silencing only slightly limited the induction of LOX by hypoxia. In this regard, it should be noted that NADPH oxidase, one of the major sources of ROS in endothelial

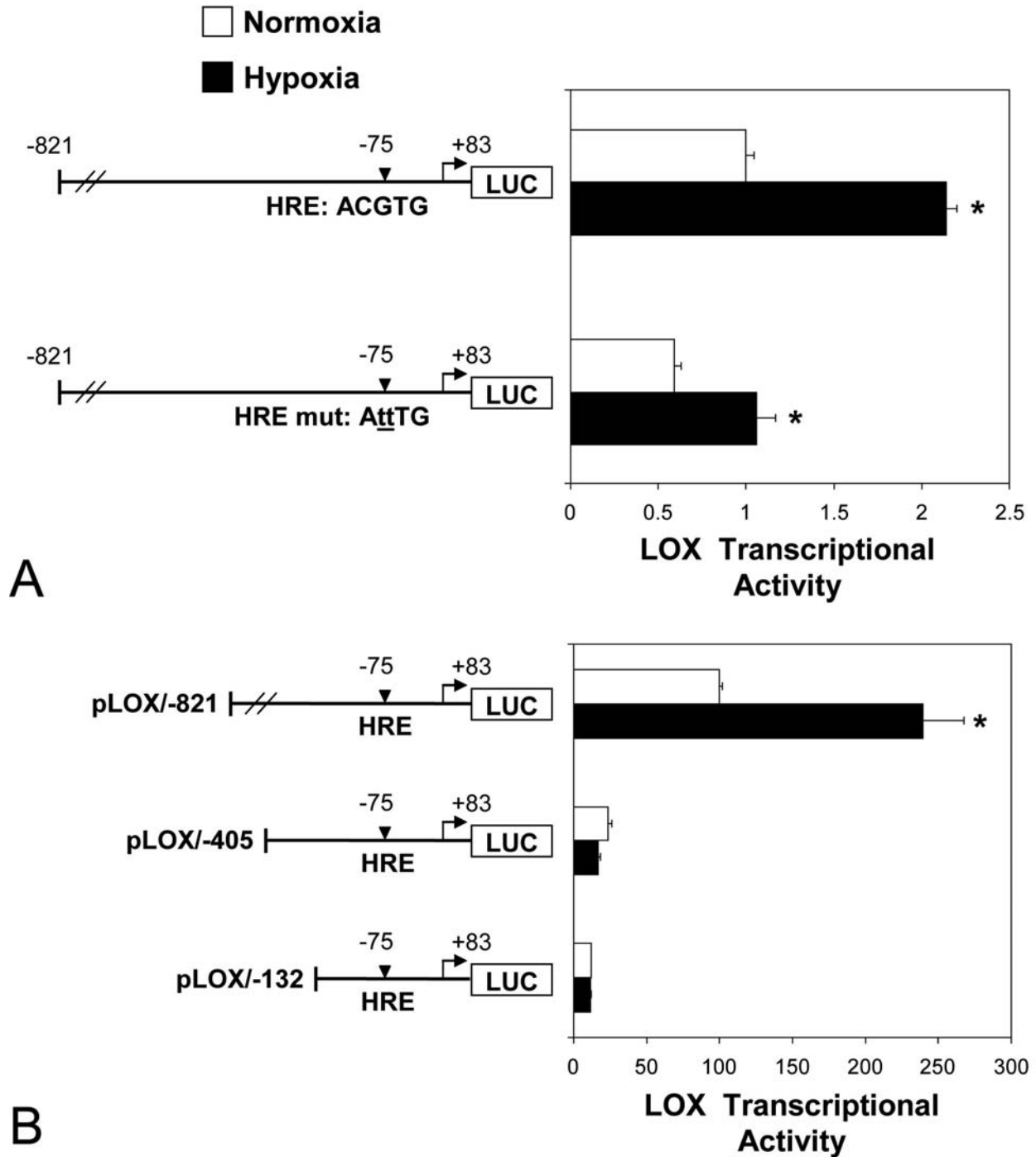


Figure 7. The up-regulation of LOX transcriptional activity by hypoxia is only partially dependent on the hypoxia response element previously identified (HRE/-75). (A) BAEC transfected with the wild-type pLOX-821 luciferase construct or the HRE-mutated vector were cultured under normoxia (white bars) or hypoxia (black bars) and luciferase was determined in cell lysates. Results were normalized by beta-galactosidase activity. The scheme corresponds to the LOX promoter region analyzed in transient transfection studies. The sequence of the putative HRE motif and the changes introduced by mutagenesis are indicated. (B) A promoter serial deletion study was performed using pLOX-821, pLOX-405 and pLOX-132 luciferase constructs. The position of the HRE is indicated. Results are expressed as mean \pm SEM (n=9; $p < 0.05$: *, vs. the same construction under normoxia).

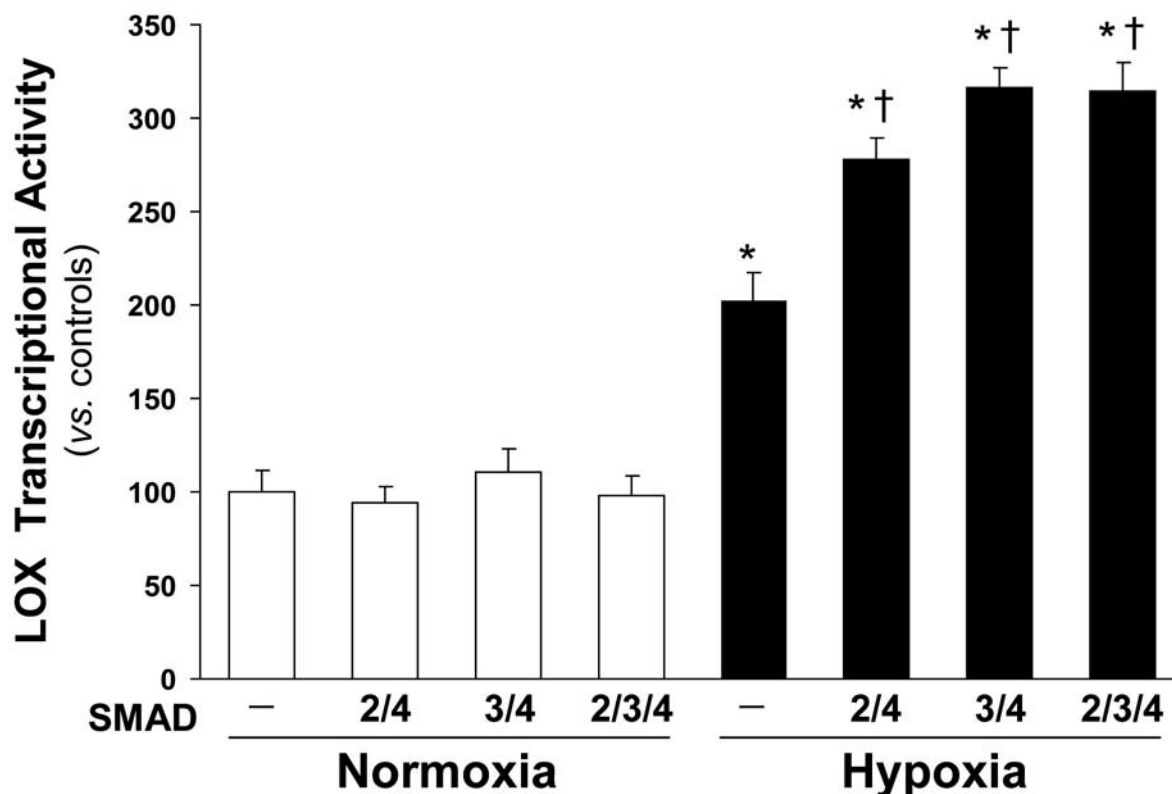


Figure 8. Smad signaling pathway is involved in hypoxia-induced up-regulation of LOX transcriptional activity. BAEC transfected with the wild-type pLOX-821 luciferase construct were co-transfected with the Smad2 and/or Smad3 expression vectors together with the Smad4 construct or the corresponding empty vector (pcDNA3), and were cultured under normoxia (white bars) or hypoxia (black bars). Results are expressed as mean \pm SEM (n=9; $p < 0.05$: *, vs. cells exposed to normoxia; †, vs. cells co-transfected with pcDNA3 empty vector (-) and exposed to hypoxia).

cells, could also contribute to hypoxic ROS generation (48) and that its role in hypoxia-dependent signaling has not been clearly established. Furthermore, Smad signaling is also able to induce ROS release (49) and hence, the effect of ROS inhibition on LOX expression should be derived from the blockade of both HIF-1 α and Smad-dependent signaling pathways.

In summary, our data support the contribution of Smad and ROS signaling in LOX up-regulation by hypoxia in endothelial cells. Further studies will be required to more accurately define the mechanisms through which the crosstalk between HIF-1, Smad and ROS signaling pathways modulates LOX promoter activity and to establish the functional consequences of LOX up-regulation by hypoxia in endothelial cells.

6. ACKNOWLEDGMENT

Jose Martinez-Gonzalez and Cristina Rodriguez equally contributed to this work. This work was partially supported by grants FS09/01797 and SAF2009-11949 and Red Tematica de Investigacion Cardiovascular (RECAVA) (RD06/0014/0027 and RD06/0014/0007) from Instituto de Salud Carlos III-Ministerio de Ciencia e Innovacion. A. Guadall was supported by a fellowship from Instituto de

Salud Carlos III-Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS). We thank Dra M Camacho for providing HUVEC. Authors are indebted with the technical assistance provided by Silvia Aguilo.

7. REFERENCES

1. G. L. Semenza. Surviving ischemia: adaptive responses mediated by hypoxia-inducible factor 1. *J Clin Invest* 106, 809-812 (2000)
2. C. W. Pugh and P. J. Ratcliffe. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med* 9, 677-684 (2003)
3. S. Germain, C. Monnot, L. Muller and A. Eichmann. Hypoxia-driven angiogenesis: role of tip cells and extracellular matrix scaffolding. *Curr Opin Hematol* 17, 245-251 (2010)
4. N. S. Chandel, D. S. McClintock, C. E. Feliciano, T. M. Wood, J. A. Melendez, A. M. Rodriguez and P. T. Schumacker. Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 α during hypoxia: a mechanism of O₂ sensing. *J Biol Chem* 275, 25130-25138 (2000)

ROS-mediated modulation of LOX by hypoxia

5. R. D. Guzy, B. Hoyos, E. Robin, H. Chen, L. Liu, K. D. Mansfield, M. C. Simon, U. Hammerling and P. T. Schumacker. Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing. *Cell Metab* 1, 401–408 (2005)
6. R. B. Hamanaka and N. S. Chandel. Mitochondrial reactive oxygen species regulate hypoxic signaling. *Curr Opin Cell Biol* 21, 894–899 (2009)
7. H. M. Kagan and W. Li. Lysyl oxidase: properties, specificity, and biological roles inside and outside of the cell. *J Cell Biochem* 88, 660–672 (2003)
8. H. M. Kagan and P. C. Trackman. Properties and function of lysyl oxidase. *Am J Respir Cell Mol Biol* 5, 206–210 (1991)
9. C. Rodriguez, B. Raposo, J. Martinez-Gonzalez, L. Casani and L. Badimon. Low density lipoproteins down-regulates lysyl oxidase in vascular endothelial cells and the arterial wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22,1409–1414 (2002)
10. B. Raposo, C. Rodriguez, J. Martinez-Gonzalez and L. Badimon. High levels of homocysteine inhibit lysyl oxidase (LOX) and down-regulates LOX expression in vascular endothelial cells. *Atherosclerosis* 177,1–8 (2004)
11. C. Rodriguez, J. F. Alcudia, J. Martinez-Gonzalez, B. Raposo, M. A. Navarro, and L. Badimon. Lysyl oxidase (LOX) down-regulation by TNF α : A new mechanism underlying TNF α -induced endothelial dysfunction. *Atherosclerosis* 196, 558–564 (2008)
12. C. Rodríguez, J. F. Alcudia, J. Martinez-Gonzalez, A. Guadall, B. Raposo, S. Sanchez-Gomez and L. Badimon. Statins normalize vascular lysyl oxidase down-regulation induced by proatherogenic risk factors. *Cardiovasc Res* 83, 595–603 (2009)
13. J. T. Erler, K. L. Bennewith, M. Nicolau, N. Dornhöfer, C. Kong, Q. T. Le, J. T. Chi, S. S. Jeffrey and A. J. Giaccia. Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. *Nature* 440, 1222–1226 (2006)
14. D. J. Manalo, A. Rowan, T. Lavoie, L. Natarajan, B. D. Kelly, S. Q. Ye, J. G. Garcia and G. L. Semenza. Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood* 105, 659–669 (2005)
15. J. Orbe, J. A. Rodriguez, O. Calvayrac, R. Rodriguez-Calvo, C. Rodriguez, C. Roncal, S. Martinez de Lizarrondo, J. Barrenetxe, J. C. Reverter, J. Martinez-Gonzalez and J. A. Páramo. Matrix metalloproteinase-10 is upregulated by thrombin in endothelial cells and increased in patients with enhanced thrombin generation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29, 2109–2116 (2009)
16. S. Heumüller, S. Wind, E. Barbosa-Sicard, H. H. Schmidt, R. Busse, K. Schröder and R. P. Brandes. Apocynin is not an inhibitor of vascular NADPH oxidases but an antioxidant. *Hypertension* 51, 211–217 (2008)
17. L. Martorell, J. Martinez-Gonzalez, J. Crespo, O. Calvayrac and L. Badimon. Neuron-derived orphan receptor-1 (NOR-1) is induced by thrombin and mediates vascular endothelial cell growth. *J Thromb Haemost* 5, 1766–1773 (2007)
18. L. Martorell, M. Gentile, J. Rius, C. Rodriguez, J. Crespo, L. Badimon L and J. Martinez-Gonzalez. The hypoxia-inducible factor 1/NOR-1 axis regulates the survival response of endothelial cells to hypoxia. *Mol Cell Biol* 29, 5828–5842 (2009)
19. J. Yanagisawa, Y. Yanagi, Y. Masuhiro, M. Suzawa, M. Watanabe, K. Kashiwagi, T. Toriyabe, M. Kawabata, K. Miyazono and S. Kato. Convergence of transforming growth factor-beta and vitamin D signaling pathways on SMAD transcriptional coactivators. *Science* 283,1317–1321 (1999)
20. M. Gonzalez-Diez, C. Rodriguez, L. Badimon and J. Martinez-Gonzalez. Prostacyclin induction by high-density lipoprotein (HDL) in vascular smooth muscle cells depends on sphingosine 1-phosphate receptors: effect of simvastatin. *Thromb Haemost* 100, 119–126 (2008)
21. C. Rodriguez, B. Raposo, J. Martinez-Gonzalez, V. Llorente-Cortes, G. Vilahur and L. Badimon. Modulation of ERG25 expression by LDL in vascular cells. *Cardiovasc Res* 58, 178–85 (2003)
22. G. L. Semenza. Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Physiology (Bethesda)* 24, 97–106 (2009)
23. M. C. Simon. Mitochondrial reactive oxygen species are required for hypoxic HIF α stabilization. *Adv Exp Med Biol* 588,165–170 (2006)
24. H. O. Akman, H. Zhang, M. A. Siddiqui, W. Solomon, E. L. Smith and O. A. Batuman. Response to hypoxia involves transforming growth factor-beta2 and Smad proteins in human endothelial cells. *Blood* 98, 3324–3331 (2001)
25. J. F. Alcudia, J. Martinez-Gonzalez, A. Guadall, M. Gonzalez-Diez, L. Badimon and C. Rodriguez. Lysyl oxidase and endothelial dysfunction: mechanisms of lysyl oxidase down-regulation by pro-inflammatory cytokines. *Front Biosci* 13, 2721–2727 (2008)
26. C. Rodriguez, J. Martinez-Gonzalez, B. Raposo, J. F. Alcudia, A. Guadall and L. Badimon. Regulation of lysyl oxidase in vascular cells: lysyl oxidase as a new player in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res* 79, 7–13 (2008)
27. C. Rodriguez, A. Rodriguez-Sinovas and J. Martinez-Gonzalez. Lysyl oxidase as a potential therapeutic target. *Drug News Perspect* 21, 218–224 (2008)
28. S. L. Payne, M. J. Hendrix and D. A. Kirschmann. Paradoxical roles for lysyl oxidases in cancer--a prospect. *J Cell Biochem* 101, 1338–1354 (2007)

ROS-mediated modulation of LOX by hypoxia

29. J. Hänze, N. Weissmann, F. Grimminger, W. Seeger and F. Rose. Cellular and molecular mechanisms of hypoxia-inducible factor driven vascular remodeling. *Thromb Haemost* 97, 774-787 (2007)
30. T. Björnheden, M. Levin, M. Evaldsson and O. Wiklund. Evidence of hypoxic areas within the arterial wall in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19, 870-876 (1999)
31. F. Kuwahara, H. Kai, K. Tokuda, R. Shibata, K. Kusaba, N. Tahara, H. Niiyama, T. Nagata and T. Imaizumi. Hypoxia-inducible factor-1 α /vascular endothelial growth factor pathway for adventitial vasa vasorum formation in hypertensive rat aorta. *Hypertension* 39, 46-50 (2002)
32. E. B. Rankin and A. J. Giaccia. The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. *Cell Death Differ* 15, 678-685 (2008)
33. D. E. Richard, E. Berra and J. Pouyssegur. Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1 α in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 275, 26765-26771 (2000)
34. C. Treins, S. Giorgetti-Peraldi, J. Murdaca, G. L. Semenza and E. Van Obberghen. Insulin stimulates hypoxia-inducible factor 1 through a phosphatidylinositol 3-kinase/target of rapamycin-dependent signaling pathway. *J Biol Chem* 277, 27975-27981 (2002)
35. D. F. Higgins, K. Kimura, W. M. Bernhardt, N. Shrimanker, Y. Akai, B. Hohenstein, Y. Saito, R. S. Johnson, M. Kretzler, C. D. Cohen, K. U. Eckardt, M. Iwano and V. H. Haase. Hypoxia promotes fibrogenesis in vivo via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 117, 3810-3820 (2007)
36. R. Schietke, C. Warnecke, I. Wacker, J. Schödel, D. R. Mole, V. Campean, K. Amann, M. Goppelt-Struebe, J. Behrens, K. U. Eckardt and M. S. Wiesener. The lysyl oxidases LOX and LOXL2 are necessary and sufficient to repress E-cadherin in hypoxia: insights into cellular transformation processes mediated by HIF-1. *J Biol Chem* 285, 6658-6669 (2010)
37. L. M. Postovit, D. E. Abbott, S. L. Payne, W. W. Wheaton, N. V. Margaryan, R. Sullivan, M. K. Jansen, K. Csiszar, M. J. Hendrix and D. A. Kirschmann. Hypoxia/reoxygenation: a dynamic regulator of lysyl oxidase-facilitated breast cancer migration. *J Cell Biochem* 103, 1369-1378 (2008)
38. N. Halberg, T. Khan, M. E. Trujillo, I. Wernstedt-Asterholm, A. D. Attie, S. Sherwani, Z. V. Wang, S. Landskroner-Eiger, S. Dineen, U. J. Magalang, R. A. Brekken and P. E. Scherer. Hypoxia-inducible factor 1 α induces fibrosis and insulin resistance in white adipose tissue. *Mol Cell Biol* 29, 4467-4483 (2009)
39. A. Alfranca, M. D. Gutierrez, A. Vara, J. Aragonés, F. Vidal and M. O. Landazuri. c-Jun and hypoxia-inducible factor 1 functionally cooperate in hypoxia-induced gene transcription. *Mol Cell Biol* 22, 12-22 (2002)
40. E. P. Cummins and C. T. Taylor. Hypoxia-responsive transcription factors. *Pflugers Arch* 450, 363-371 (2005)
41. C. Sahlgren, M. V. Gustafsson, S. Jin, L. Poellinger and U. Lendahl. Notch signaling mediates hypoxia-induced tumor cell migration and invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 6392-6397 (2008)
42. S. Zhou, S. Lechpammer, J. S. Greenberger and J. Glowacki. Hypoxia inhibition of adipocytogenesis in human bone marrow stromal cells requires transforming growth factor-beta/Smad3 signaling. *J Biol Chem* 280, 22688-22696 (2005)
43. H. Zhang, H. O. Akman, E. L. Smith, J. Zhao, J. E. Murphy-Ullrich and O. A. Batuman. Cellular response to hypoxia involves signaling via Smad proteins. *Blood* 101, 2253-2260 (2003)
44. T. Sanchez-Elsner, L. M. Botella, B. Velasco, A. Corbi, L. Attisano and C. Bernabeu. Synergistic cooperation between hypoxia and transforming growth factor-beta pathways on human vascular endothelial growth factor gene expression. *J Biol Chem* 276, 38527-38535 (2001)
45. T. Sanchez-Elsner, L. M. Botella, B. Velasco, C. Langa and C. Bernabau. Endoglin expression is regulated by transcriptional cooperation between the hypoxia and transforming growth factor-beta pathways. *J Biol Chem* 277, 43799-43808 (2002)
46. J. Samarin, J. Wessel, I. Cicha, S. Kroening, C. Warnecke and M. Goppelt-Struebe. FoxO proteins mediate hypoxic induction of connective tissue growth factor in endothelial cells. *J Biol Chem* 285, 4328-4336 (2010)
47. L. M. Yung, F. P. Leung, X. Yao, Z. Y. Chen and Y. Huang. Reactive oxygen species in vascular wall. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 6, 1-19 (2006)
48. M. Ushio-Fukai, N. Urao. Novel role of NADPH oxidase in angiogenesis and stem/progenitor cell function. *Antioxid Redox Signal* 11, 2517-2533 (2009)
49. D. Black, S. Lyman, T. Qian, J. J. Lemasters, R. A. Rippe, T. Nitta, J. S. Kim and K. E. Behrns. Transforming growth factor beta mediates hepatocyte apoptosis through Smad3 generation of reactive oxygen species. *Biochimie* 89, 1464-1473 (2007)

Abbreviations: ECM: extracellular matrix; LOX: lysyl oxidase; LOXL: LOX-like; ROS: reactive oxygen species; HIF: hypoxia inducible factor; ARNT: aryl hydrocarbon-receptor nuclear translocator; BAEC: bovine aortic endothelial cells; HUVEC: human umbilical vein endothelial cells; MLEC: mouse lung endothelial cells; ICAM: intercellular adhesion molecule; mTOR: mammalian target of rapamycin; VEGF: vascular endothelial growth factor; TBP: TATA binding protein;

ROS-mediated modulation of LOX by hypoxia

BAPN: beta-aminopropionitrile; HRE: hypoxia response element; SBE: Smad binding element; TGF: transforming growth factor.

Key Words: Endothelial Cells, Hypoxia, Reactive Oxygen Species, Lysyl Oxidase

Send correspondence to: Cristina Rodriguez or Jose Martinez-Gonzalez, Centro de Investigacion Cardiovascular (CSIC-ICCC), Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (pabellon N° 11), c/ Antoni Maria Claret 167, 08025, Barcelona, Spain, Tel: 34-93-5565897, Fax: 34-93-5565559, E-mail: crodriguez@csic-iccc.org or jmartinez@csic-iccc.org

<http://www.bioscience.org/current/vol3E.htm>

Fibulin-5 Is Up-regulated by Hypoxia in Endothelial Cells through a Hypoxia-inducible Factor-1 (HIF-1 α)-dependent Mechanism*

Received for publication, July 12, 2010, and in revised form, December 20, 2010. Published, JBC Papers in Press, December 30, 2010, DOI 10.1074/jbc.M110.162917

Anna Guadall¹, Mar Orriols, Ricardo Rodríguez-Calvo², Olivier Calvayrac, Javier Crespo, Rosa Aledo, José Martínez-González, and Cristina Rodríguez³

From the Centro de Investigación Cardiovascular, Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Institut Català de Ciències Cardiovasculars, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Sant Pau, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Sant Antoni Maria Claret 167, 08025 Barcelona, Spain

Hypoxia modulates gene expression and affects multiple aspects of endothelial cell biology. Fibulin-5 (FBLN5) is an extracellular matrix protein essential for elastic fiber assembly and vasculogenesis that participates in vascular remodeling and controls endothelial cell adhesion, motility, and proliferation. In this context, we aimed to analyze FBLN5 regulation by hypoxia in endothelial cells. Hypoxia (1% O₂) increased FBLN5 mRNA levels in endothelial cells in a time-dependent manner. Maximal induction (~2.5-fold) was achieved after 24 h of hypoxia. This effect paralleled an increase in both intracellular and extracellular FBLN5 protein levels. The increase in FBLN5 mRNA levels observed in hypoxic cells was blocked by inhibitors of the PI3K/Akt/mTOR pathway (LY294002 and rapamycin) and mimicked by dimethyl oxal glycine, which prevents proline hydroxylase-mediated degradation of HIF-1 α . Silencing of HIF-1 α completely prevented hypoxia-induced FBLN5 up-regulation. Accordingly, both hypoxia and HIF-1 α overexpression increased FBLN5 transcriptional activity. Serial promoter deletion and mutagenesis studies revealed the involvement of a putative hypoxia response element (HRE) located at -78 bp. In fact, EMSA and CHIP assays demonstrated increased HIF-1 binding to this site in hypoxic cells. Interestingly, the rate of endothelial cells undergoing apoptosis in cultures exposed to hypoxia increased in FBLN5 knockdown cells, suggesting that hypoxia-induced FBLN5 expression contributes to preserve cell survival. These results provide evidence that HIF-1 signaling underlies the increase of FBLN5 expression elicited by hypoxia in endothelial cells and suggest that FBLN5 induction could be involved in the adaptive survival response of endothelial cells to hypoxia.

Endothelial cells are primary sensors to the hypoxic stress characteristic of some physiological processes and diseases such as cancer, ischemic disorders, chronic inflammation, and atherosclerosis. The adaptive response of endothelial cells to hypoxia involves a complex coordinated response affecting multiple aspects of endothelial cell biology (1). Hypoxia is the major driving force for neovascularization through the modulation of a cascade of genes and proteins that promote endothelial cell sprouting and proliferation (2). Furthermore, hypoxia triggers cell survival, activates DNA repair processes, enhances glucose uptake and metabolism, alters vascular tone and coagulant function, modulates endothelial permeability and cell adhesive properties, and promotes extracellular matrix (ECM)⁴ remodeling (1, 3, 4).

The hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) is a critical mediator of cellular responses to hypoxia (2). HIF-1, the prototype of this family, is a heterodimeric basic helix-loop-helix transcription factor composed of HIF-1 β (constitutive subunit) and HIF-1 α (oxygen-sensitive subunit). In normoxic conditions, HIF-1 α is degraded by a mechanism involving hydroxylation of two prolyl residues by specific prolyl hydroxylases, ubiquitylation, and proteasomal degradation through a von Hippel-Lindau-dependent pathway. Conversely, under hypoxic conditions, HIF-1 α hydroxylation is inhibited leading to increased HIF-1 α levels that, in turn, results in an enhancement of HIF-1-dependent transcriptional responses (5–7). HIF-1 controls multiple aspects of endothelial behavior including cell proliferation, chemotaxis, ECM penetration, and wound healing (8).

Fibulin 5 (FBLN5) is a widely expressed ECM glycoprotein that colocalizes with elastic fibers and is essential for proper elastic fiber assembly and vasculogenesis (9–13). Altered FBLN5 expression has been linked to several pathological processes, including tumor progression (14). In the vascular wall, the up-regulation of FBLN5 observed in atherosclerotic plaques and in neointimal thickening induced by balloon injury suggests its role in vascular remodeling (10, 15, 16). In fact, FBLN5 binds to $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, and $\alpha_9\beta_1$ integrins and pro-

* This work was supported in part by Grants PS09/01797 and SAF2009-11949 and Red Temática de Investigación Cardiovascular (RD06/0014/0027) from the Ministerio de Ciencia e Innovación-Instituto de Salud Carlos III (Fondo de Investigaciones Sanitarias).

¹ Supported by a fellowship from Instituto de Salud Carlos III-Fondo de Investigaciones Sanitarias.

² Supported by the Ministerio de Ciencia e Innovación (Juan de la Cierva program).

³ To whom correspondence should be addressed: Centro de Investigación Cardiovascular (Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Institut Català de Ciències Cardiovasculars), Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Pabellón 11), Sant Antoni Maria Claret 167, 08025 Barcelona, Spain. Tel.: 34-935565897; Fax: 34-935565559; E-mail: crodriguezcs@csic-iccc.org.

⁴ The abbreviations used are: ECM, extracellular matrix; FBLN, fibulin; HIF, hypoxia-inducible factor; BAEC, bovine aortic endothelial cells; HUVEC, human umbilical vein endothelial cells; mTOR, mammalian target of rapamycin; VEGF, vascular endothelial growth factor; HRE, hypoxia response element; PI, propidium iodide.

Hypoxia Induces *FBLN5* Expression

motes endothelial cell adhesion via its Arg-Gly-Asp (RGD) motif (10, 11, 15). Furthermore, it has been reported that *FBLN5* inhibits endothelial and vascular smooth muscle cell proliferation and migration (16–18) and displays anti-angiogenic properties both *in vivo* and *in vitro* (19, 20).

FBLN5 has been associated with different vascular processes involving ECM remodeling; however, little is known about the mechanisms underlying its regulation in vascular cells. This study identifies *FBLN5* as a hypoxia-responsive gene in endothelial cells, dissects the molecular mechanisms underlying this regulation, and delineates its biological significance.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell Culture—Bovine aortic endothelial cells (BAEC; Clonetics) were cultured in RPMI 1640 (Invitrogen), supplemented with 10% FCS (Biological Industries), antibiotics (0.1 mg/ml streptomycin, 100 units/ml penicillin G), and 2 mM L-glutamine (Invitrogen) as described previously (21). Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were obtained by collagenase digestion and cultured in medium M199 (Biological Industries) supplemented with 20 mM HEPES, pH 7.4 (Invitrogen), 30 μ g/ml endothelial cell growth supplement (Millipore), 100 μ g/ml heparin (Sigma), 20% FCS, and antibiotics (22). Mouse lung endothelial cells were isolated from lungs of C57BL/6 mice by collagenase A (Roche Applied Science) digestion followed by selection with intercellular adhesion molecule 2-coated magnetic beads (Invitrogen) as described previously (23). Endothelial cells were used between the third and fifth passage. The human epithelioid carcinoma HeLa cell line was cultured in DMEM (Invitrogen) supplemented with 10% FCS and antibiotics. Cells were maintained in standard culture conditions (21% O₂, 5% CO₂, 95% humidity) until subconfluence. Cells were exposed to hypoxia (1% O₂, 5% CO₂, balanced with N₂) in a Forma Series II hypoxic incubator (model 3141; Thermo Electron Corp.). The mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitor rapamycin (100 nM; Sigma) and PI3K inhibitor LY294002 (10 μ M; Calbiochem) were added 1 h prior the hypoxic stimulus. No cytotoxicity, analyzed by the trypan blue exclusion test and the XTT-based assay for cell viability (Roche Applied Science), was observed after the treatment with either of these compounds.

Real-time PCR—Total RNA was isolated using UltraspecTM (Biotecx) following manufacturer's instructions. RNA (1 μ g) was reverse transcribed into cDNA using the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems) in the presence of random hexamers. Quantification of mRNA levels was performed by real-time PCR using an ABI PRISM 7900HT sequence detection system (Applied Biosystems) and specific primers and probes provided by the Assay-on-Demand system for *FBLN2* (Hs00157482_m1), *FBLN3* (Hs00244575_m1), *FBLN5* (Hs00197064_m1), *HIF-1 α* (Hs00153153_m1), *HIF-2 α* (Hs01026149_m1), and vascular endothelial growth factor (VEGF)-A (Hs00173626_m1). TATA-binding protein was used as an endogenous control (Hs99999910_m1) (24). Each sample was amplified in duplicate.

Confocal Microscopy—HUVEC were plated at a density of 2×10^4 cells onto 12-mm diameter glass-bottomed dishes (Willco Wells B.V.) coated with gelatin. Cells were maintained in normoxia or exposed to hypoxia as described above. Afterward, cells were fixed with 4% paraformaldehyde and permeabilized with 0.5% Tween[®] 20. The permeabilization step was avoided in those experiments aimed to demonstrate the extracellular localization of *FBLN5*. Then, cells were incubated with a mouse monoclonal antibody against *FBLN5* (Abcam (ab36611); 1:2000) for 1 h, washed, and incubated for 1 h with a fluorescence-conjugated secondary antibody (donkey anti-mouse Alexa Fluor 488; Molecular Probes). Nuclei and actin fibers were stained with Hoechst 33342 and Alexa Fluor 633-phalloidin, respectively (Molecular Probes). Fluorescence images were acquired with a Leica DMIRE2 confocal microscope using Leica Confocal Software.

***FBLN5* Promoter Constructs**—A 1667-bp fragment of the human *FBLN5* promoter (–1650 to +17 related to the start codon) was amplified by PCR from genomic DNA and cloned into the pGL3 basic luciferase reporter vector (Promega) using KpnI-XhoI restriction sites (pFBLN5–1650). Two serial deletion constructs (–635 to +17 and –329 to +17) were generated by PCR amplification from pFBLN5–1650 (pFBLN5–635 and pFBLN5–329, respectively). Primers used were: pFBLN5–1650 (upper primer), 5'-TTAAGGTACC-CCTTTGGTTGCCCTTACTTTATT-3'; pFBLN5–635 (upper primer), 5'-GAGTTCGGTACCCTTTCTTCCG-GAGGCGA-3'; pFBLN5–329 (upper primer), 5'-TGTA-ATCGGTACCAGCTGTGTCCAGACTG-3'; and the reverse primer, 5'-TAACTCAGGTCCAAGACGCGGAGGAG-GAGATGCGAA-3'. (The KpnI sites in upper primers and the XhoI site in the reverse primer are *underlined*.) All constructs were confirmed by DNA sequencing.

Transient Transfection Assays—Transient transfections of BAEC were performed with LipofectinTM (Invitrogen) and the *FBLN5* constructs described above together with pSV β -galactosidase as an internal control (Promega) (25). In co-transfection experiments, performed in cells maintained under normoxic conditions, a HIF-1 α expression vector (pHIF-1 α), kindly provided by Dr. L. E. Huang (Laboratory of Human Carcinogenesis, NCI, National Institutes of Health, Bethesda, MD), or the corresponding empty vector (pCDNA3) were used (26). Transient transfection assays of subconfluent BAEC were performed in six-well plates with 1 μ g/well of the indicated construct, 0.3 μ g/well of pSV β -galactosidase, and 3 μ l of LipofectinTM. The complexes DNA/liposome were added to the cells for 7 h. After 24 h, transfected cells were exposed to hypoxia for 18 h. Luciferase activity was measured in cell lysates using the Luciferase assay kit (Promega) and a luminometer (Orion I, Berthold Detection Systems) according to the manufacturer. Results were normalized by β -galactosidase activity using the Enzyme Assay SystemTM (Promega). In some EMSA experiments, HeLa cells grown in 100-mm² plates were transfected with 8 μ g/plate of the HIF-1 α expression vector (pHIF-1 α) or its corresponding empty vector (pCDNA3) and 32 μ l of LipofectamineTM (Invitrogen). Cells were incu-

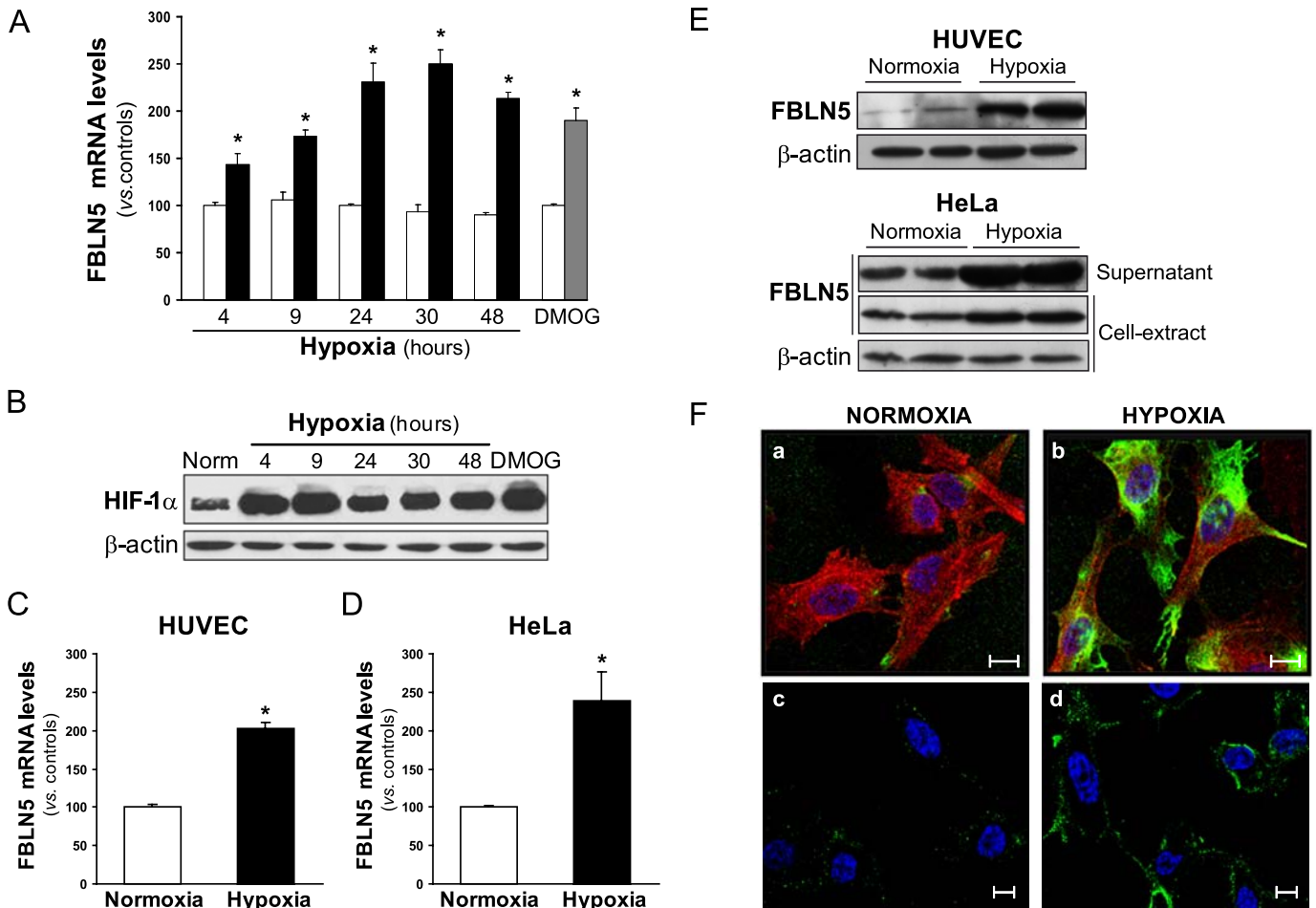


FIGURE 1. Hypoxia increases FBLN5 expression. BAEC were maintained under normoxic conditions (white bars), exposed to hypoxia (1% O₂; black bars) during different times or treated with dimethyl oxal glycine (0.5 mM, 24 h; gray bar). **A**, FBLN5 mRNA levels were evaluated by real-time PCR and were normalized by TATA-binding protein expression levels. Data are expressed as mean ± S.E. (n = 9; *, p < 0.05 versus control cells). **B**, HIF-1α protein levels were evaluated in cell lysates by Western blot. Unchanged levels of β-actin are shown as a loading control (Norm, normoxia). Autoradiograms are representative of two independent experiments performed in duplicate. **C** and **D**, FBLN5 mRNA levels were analyzed in HUVEC (**C**) and HeLa (**D**) exposed to hypoxia for 24 h. Data are expressed as mean ± S.E. (n = 9; *, p < 0.05 versus control cells). **E**, HUVEC and HeLa were maintained under normoxia or exposed to hypoxia for 48 h. FBLN5 protein levels were analyzed by Western blot from whole-cell extracts or supernatant from cell cultures. β-Actin levels were used as a loading control. A representative autoradiogram of three independent experiments performed by duplicate is shown. **F**, FBLN5 localization was analyzed by immunocytochemistry in HUVEC maintained in normoxia (**a** and **c**) or exposed to hypoxia (**b** and **d**). In permeabilized cells, intracellular FBLN5 staining (green) was detected in the perinuclear region and in cell periphery (**a** and **b**). Extracellular localization was analyzed in nonpermeabilized cells (**c** and **d**). Cells were counterstained with Hoechst to highlight nuclei (blue) and with Alexa Fluor 633-phalloidin to visualize F-actin (red). Bar, 10 μm.

bated for 3 h with the DNA-liposome complex. Plates were processed to obtain nuclear extracts 40 h after transfection.

Site-directed Mutagenesis—The FBLN5 HRE site located at position -78 was mutated using the QuikChange II Site-directed mutagenesis kit (Stratagene) according to the manufacturer's instructions (27). The HRE mutation was introduced with primers: 5'-CAGAGGAGGCCGtttTGCCCCGAGCTCCTCC-3' and 5'-GGAGGAGCTCGGGCAaaaCGGCTCCTCTG-3' (putative site is *underlined*, and changes are indicated in *lowercase letters*) using the pFBLN5-329 vector as a template. Mutation was confirmed by DNA sequencing.

siRNA Transfection—Silencer predesigned siRNA targeting HIF-1α (42840, Ambion), HIF-2α (s4699, Ambion), FBLN5 (L-017621-00; Dharmacon) or the corresponding control siRNAs, Silencer™ Negative Control no. 1 (Ambion) and ON-TARGETplus siCONTROL (catalog no. D-001810-10; Dharmacon) were transfected in HUVEC using an Amaxa Nucleofector™ and the HUVEC Nucleofector kit according

to the manufacturer's instructions (Amaxa) as described previously (28). Briefly, electroporation was carried out with 1 × 10⁶ cells and 1 μg of siRNA with the U-001 program. After electroporation, cells were resuspended in 1.5 ml of pre-warmed cell culture medium and seeded in six-well plates (350,000 cells/well). After 24 h, cells were subjected to hypoxic or normoxic conditions. Gene knockdown was verified by real time-PCR and/or Western-blot as indicated.

Nuclear Extract Preparation—HeLa cells were grown in 100-mm dishes under normoxic or hypoxic conditions for 24 h. Alternatively, HeLa were transfected with the HIF-1α expression vector (pHIF-1α) or its corresponding empty vector (pcDNA3) as described above. Cells were collected in ice-cold PBS and nuclear extracts were obtained using the NucBuster Protein Extraction Kit (Novagen) according to the manufacturer's recommendations. Proteins were quantified by the BCA protein assay™ (Pierce), and nuclear extracts were aliquoted and stored at -80 °C until used. The increase

Hypoxia Induces FBLN5 Expression

in nuclear levels of HIF-1 α elicited by either hypoxia or HIF-1 α overexpression was verified by Western blot.

EMSA—Two double-stranded DNA probes, one containing the putative wild-type HRE element present in the *FBLN5* promoter (positions from -78 to -74) and the other mutated at three bases of this HRE, were generated from the annealing of single-stranded complementary oligonucleotides as follows: FBLN5-HRE, 5'-GAGGAGGCCGACGTGCCCCGAGCTCC-3' and its complement; and FBLN5mut-HRE, 5'-GAGGAGGCCGTTTTGCCCCGAGCTCC-3' and its complement. (Wild-type and mutated HRE sites are *underlined*.) Purified probes were end-labeled with [γ - 32 P]ATP (PerkinElmer Life Science) and T4 polynucleotide kinase (Roche Applied Science) (29). EMSA assays were performed using the Novagen's EMSA accessory kit. Briefly, nuclear proteins (4 μ g) were incubated for 15 min on ice with 0.01 units poly(dI-dC)·poly(dI-dC) and 500 ng of sonicated salmon sperm DNA, in 20 mM HEPES, pH 8, 0.2 mM EDTA, 100 mM KCl, 20% glycerol, and 0.5 mM DTT. Approximately 40,000 cpm of the appropriate 32 P end-labeled probe were then added to the reaction mixture and incubated for 30 min on ice in a final volume of 20 μ l. For the supershift assay, 2 μ g of an anti-HIF-1 α antibody (ab16066; Abcam) were added to the reactions. Protein-DNA complexes were resolved by electrophoresis at 4 $^{\circ}$ C on 5% polyacrylamide, 5% glycerol gels in 0.5 \times TBE. The gels were dried and subjected to autoradiography using a Storage Phosphor Screen (GE Healthcare). Shifted bands were detected using a Typhoon 9400 scanner (Amersham Biosciences).

ChIP Assay—ChIP assays were performed using the HIF-1 α ExactaChIPTM kit according to the manufacturer's protocol (R&D Systems). Briefly, HUVEC cultured under normoxic and hypoxic conditions were cross-linked with 1% formaldehyde for 15 min. The cross-linked reaction was stopped by adding glycine to a final concentration of 125 mM. Then, cells were washed, harvested by scraping, lysed, and sonicated to shear chromatin to DNA fragments of 0.5–1 kb. Lysates were centrifuged, and an aliquot of supernatant (20 μ l) was saved as input DNA. Supernatants were then immunoprecipitated with an anti-HIF-1 α antibody (5 μ g) or an IgG as a control for nonspecific binding of DNA. Immunoprecipitates were recovered by addition of streptavidin-agarose beads (Sigma). After washing, 100 μ l of chelating resin solution (R&D Systems) were added to the beads and boiled for 10 min. Finally, DNA was purified and concentrated using the QIAquick PCR purification kit (Qiagen). Purified DNA was analyzed by conventional and real-time PCR with primers designed to amplify the human *FBLN5* gene from -245 to $+59$ (sequence positions relative to the ATG): upper primer, 5'-GCTA-AGCAAACCAGGTGCT-3' and lower primer, 5'-GTGC-GAAGGCGAGAAGAAA-3'. As a positive control, a conventional PCR analysis using VEGF-specific oligonucleotides provided by the kit was also carried out. Real-time PCR was performed in samples from two individual ChIP assays by triplicate with the QuantifastTM SYBR[®] Green PCR kit (Qiagen). The relative abundance of specific sequences in immunoprecipitated DNA was determined using the $\Delta\Delta$ Ct method. Quantifications were corrected to account for 4% inputs (4).

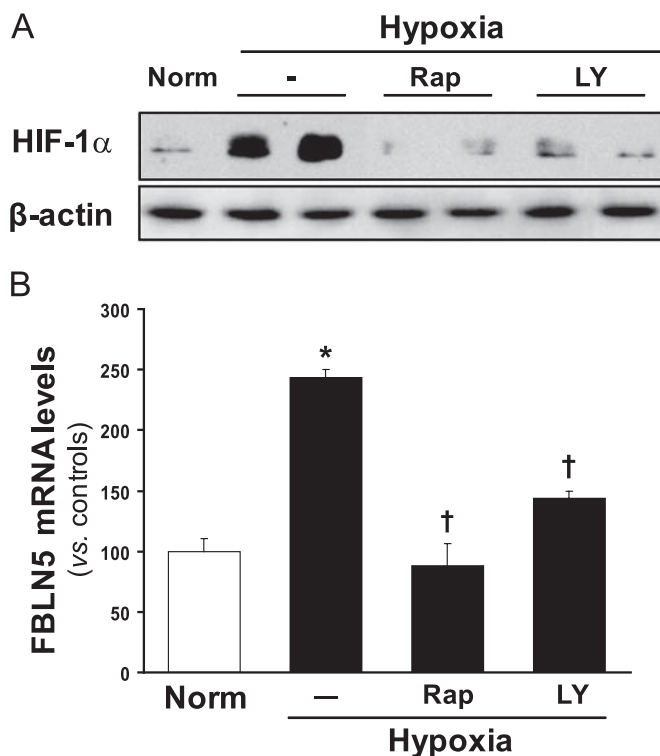


FIGURE 2. The increase in FBLN5 expression elicited by hypoxia is mediated by the PI3K/Akt/mTOR pathway. BAEC were preincubated with rapamycin (*Rap*; 100 nM) or LY294002 (*LY*; 10 μ M) and exposed to normoxia (*Norm*, controls) or hypoxia (1% O₂, 24 h). **A**, HIF-1 α protein levels were analyzed by Western blot. β -Actin levels were used as a loading control. A representative autoradiogram of three independent experiments performed by duplicate is shown. **B**, FBLN5 mRNA levels were evaluated by real-time PCR. Data are expressed as mean \pm S.E. ($n = 9$; * and †, $p < 0.05$ versus control cells and versus hypoxic cells, respectively).

Western Blot Analysis—Whole-cell extracts were obtained from endothelial cell cultures as described (30). Briefly, cells were washed twice with PBS and lysed with a lysis buffer containing 50 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 100 mM NaF, 10 mM sodium pyrophosphate, 10 mM EDTA, 2 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF, 5 μ M leupeptin, and 0.5% SDS. Nuclear and whole-cell extracts were resolved by SDS-PAGE and transferred to 0.45- μ m nitrocellulose filters (Bio-Rad). In some experiments, supernatants from HeLa cultured under normoxia or exposed to hypoxia and concentrated using Amicon Ultra 10K filter units (Millipore) were used. Blots were incubated with antibodies directed against HIF-1 α (NB100–449A, Novus; 1:500), HIF-2 α (ab199, Abcam; 1:300), FBLN5 (sc30170; Santa Cruz Biotechnology; 1:300); Akt (9272, Cell Signaling); phosphorylated-Akt (Ser⁴⁷³) (antibody no. 9271, Cell Signaling), ERK1/2 (antibody no. 9102, Cell Signaling) and phospho-ERK1/2 (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴) (antibody no. 9106, Cell Signaling). Bound antibodies were detected after incubation with a HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG and using the SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Pierce). Equal loading of protein in each lane was verified by Ponceau staining and by β -actin (for whole-cell extracts) or nucleolin (for nuclear extracts) signal (31, 32).

Annexin V Binding by Flow Cytometry—Annexin V binding was used as an index of cell apoptosis. HUVEC were transfected with a siRNA against FBLN5 or with a SilencerTM Neg-

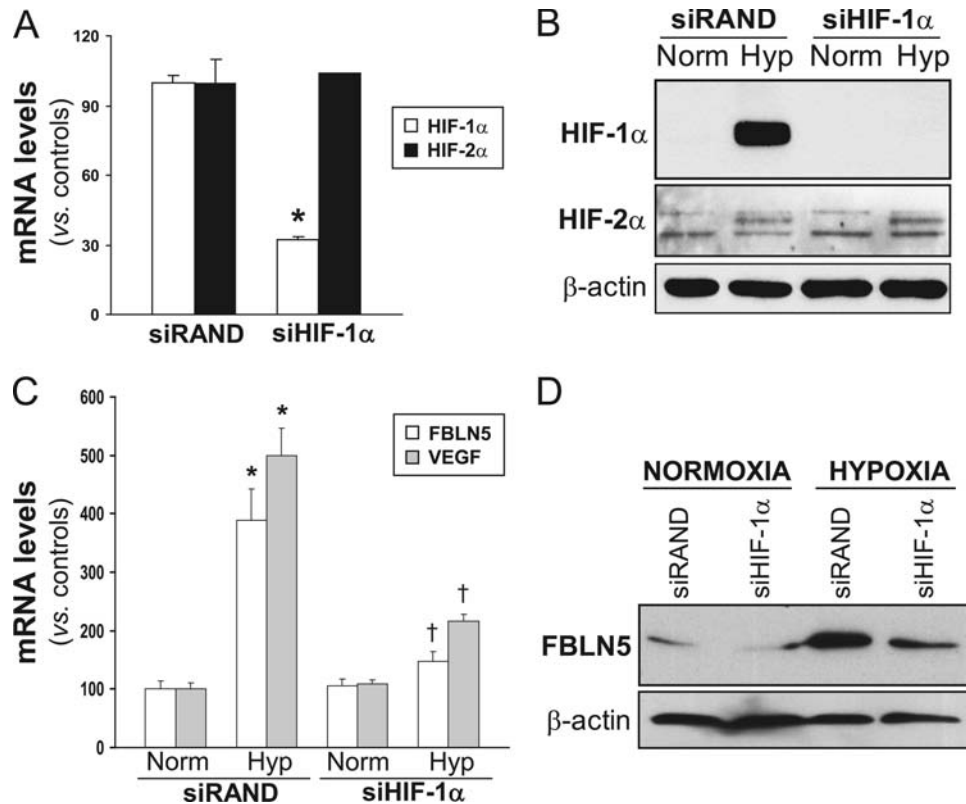


FIGURE 3. HIF-1 α silencing abrogates hypoxia-induced FBLN5 up-regulation. *A*, HUVEC were transfected with a HIF-1 α specific siRNA (siHIF-1 α) or a control siRNA (siRAND), and HIF-1 α and HIF-2 α mRNA levels were determined by real-time PCR. Data are expressed as mean \pm S.E. ($n = 6$; *, $p < 0.05$ versus siRAND cells). *B*, Western blot analysis confirms the blockade of HIF-1 α protein levels by siHIF-1 α under hypoxic conditions, whereas HIF-2 α expression remained unchanged (Norm, normoxia; Hyp, hypoxia). *C*, HIF-1 α silencing prevents the hypoxia-mediated up-regulation of FBLN5 and VEGF mRNA levels evaluated by real-time PCR. Results are expressed as mean \pm S.E. ($n = 9$; * and †, $p < 0.05$ versus normoxic cells transfected with a siRAND and versus hypoxic cells transfected with a siRAND, respectively). *D*, FBLN5 protein levels were analyzed by Western blot in HUVEC transfected with a siHIF-1 α or a control siRNA (siRAND) under normoxic or hypoxic conditions. A representative autoradiogram of two independent experiments is shown.

ative Control no. 1 as described above. Then, cells were arrested and exposed to hypoxia for 16 h. Finally, cells were trypsinized, resuspended in $1 \times$ annexin V binding buffer (BD Pharmingen) and incubated with annexin V conjugated with FITC (annexin V-FITC) (BD Pharmingen) and propidium iodide (PI) (BD Pharmingen). Annexin V-FITC and PI binding was analyzed by FACS in an EPICS[®] XL[™] Flow Cytometer. Results were expressed as percentage of total cell population. Annexin V-FITC fluorescence (abscissa) was plotted versus PI uptake (ordinate). Data were gated for damaged cells (annexin V⁻ and PI⁺), necrotic cells (annexin V⁺ and PI⁺), viable cells (annexin V⁻ and PI⁻), and apoptotic cells (annexin V⁺ and PI⁻).

Statistical Analysis—Data are expressed as mean \pm S.E. Means were compared by one-factor analysis of variance followed by Fisher protected least significant difference to assess specific group differences. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

RESULTS

Hypoxia Induces FBLN5 Expression in Endothelial Cells—It has been previously demonstrated that FBLN5 regulates endothelial cell function (16–20). Here, we tested whether hypoxia could modulate FBLN5 expression in endothelial cells. We found that FBLN5 expression was enhanced in a time-de-

pendent manner in BAEC exposed to hypoxia (1% O₂). FBLN5 mRNA levels progressively increased from 4 h to reach a plateau after 24–48 h of hypoxia (2.5-fold) (Fig. 1A). Similarly, dimethyl oxalylglycine, which prevents proline hydroxylase-mediated proteasomal degradation of HIF-1 α mimicking hypoxia (33), markedly up-regulated FBLN5 expression in endothelial cells (Fig. 1A). Dimethyl oxalylglycine and hypoxia strongly raised HIF-1 α protein levels, with an increase observed at 4 h and even after 48 h of hypoxia exposure (Fig. 1B). In these conditions, mRNA levels of VEGF, a well known hypoxia-regulated gene were also up-regulated (data not shown). The induction of FBLN5 expression under hypoxic conditions was also observed in other primary endothelial cells such as mouse lung endothelial cells (data not shown) and HUVEC (Fig. 1C) and in the human epithelioid carcinoma HeLa cell line (Fig. 1D), indicating that such regulation is not restricted to endothelial cells. FBLN5 protein levels evaluated by Western blot in whole-cell lysates revealed a marked enhancement of FBLN5 expression in both HUVEC and HeLa exposed to hypoxia (Fig. 1E). In agreement, immunocytochemistry analysis demonstrated that hypoxia markedly increased intracellular FBLN5 levels. FBLN5 staining was mainly localized in the perinuclear region and in the cell periphery (Fig. 1F, panels a and b). Hypoxia also augmented the

Hypoxia Induces FBLN5 Expression

extracellular presence of FBLN5 as we showed by confocal microscopy studies performed in nonpermeabilized cells (Fig. 1F, panels *c* and *d*) and by immunoblot analysis of concentrated supernatants from HeLa cultures (Fig. 1E, lower panel).

PI3K/Akt/mTOR Axis Is Involved in FBLN5 Induction by Hypoxia—The PI3K/Akt/mTOR pathway has been implicated in the regulation of HIF-1 protein levels (6). To define the role of this signaling pathway in the induction of FBLN5 by hypoxia, we examined the effect of LY294002 and rapamycin, compounds that inhibit PI3K and mTOR, respectively. Western blot analysis confirmed that both inhibitors prevented the induction of HIF-1 α protein levels caused by hypoxia (Fig. 2A). Accordingly, the increase in FBLN5 mRNA levels observed in hypoxic cells was completely blocked by pretreatment with either LY294002 or rapamycin (Fig. 2B). These compounds neither alter HIF-1 α protein levels nor FBLN5 expression under basal conditions (normoxia; data not shown). These results evidence the involvement of the PI3K/Akt/mTOR pathway on FBLN5 up-regulation by hypoxia.

HIF-1 α Inhibition Prevents FBLN5 Induction by Hypoxia—To further evaluate the contribution of HIF-1 α in FBLN5 regulation, knockdown experiments using a specific siRNA against HIF-1 α (siHIF-1 α) were performed. siHIF-1 α strongly reduced HIF-1 α mRNA levels and prevented the increase of HIF-1 α protein levels elicited by hypoxia (Fig. 3, A and B). In these conditions HIF-1 α knockdown counteracted the up-regulation of FBLN5 mRNA and protein levels triggered by hypoxia (Fig. 3, C and D). As expected, hypoxia-induced up-regulation of VEGF, a well established HIF-1 α target gene, was abolished by siHIF-1 α (Fig. 3C). HIF-1 α knockdown neither affected HIF-2 α mRNA levels (Fig. 3A) nor prevented the hypoxia-mediated induction of HIF-2 α protein levels in HUVEC (Fig. 3B), thus confirming the specificity of our approach. It should be noted that, as described previously (34), the up-regulation of HIF-2 α expression by hypoxia in these cells is markedly lower than that of HIF-1 α (Fig. 3B), suggesting a major role of HIF-1 α on hypoxia-induced FBLN5 up-regulation. In agreement, the specific silencing of HIF-2 α (Fig. 4A) was not able to prevent the up-regulation of FBLN5 observed under hypoxic conditions (Fig. 4, B and C).

Hypoxia Increases FBLN5 Transcriptional Activity through an HRE—Data described above suggest that under hypoxic conditions HIF-1 α could increase FBLN5 transcriptional activity. To examine this hypothesis, a pGL3 luciferase reporter construct harboring 1650 bp of the FBLN5 promoter (upstream ATG) was generated and used in transient transfection studies. As shown in Fig. 5A, hypoxia induced FBLN5 transcriptional activity \sim 2-fold. Similarly, cotransfection with a HIF-1 α expression vector (pHIF-1 α) increased FBLN5 promoter activity as compared with empty vector-transduced cells (Fig. 5B). A serial promoter deletion analysis determined that the proximal 329-bp region retains hypoxia and HIF-1 α responsiveness (Fig. 5D). Of note, further deletions completely abolished transcriptional activity (data not shown) in agreement with a previous report that describes the requirement of sequences between -392 and -315 for basal promoter activity (35). *In silico* studies using MatInspector software for the analysis of transcription binding sites identified a

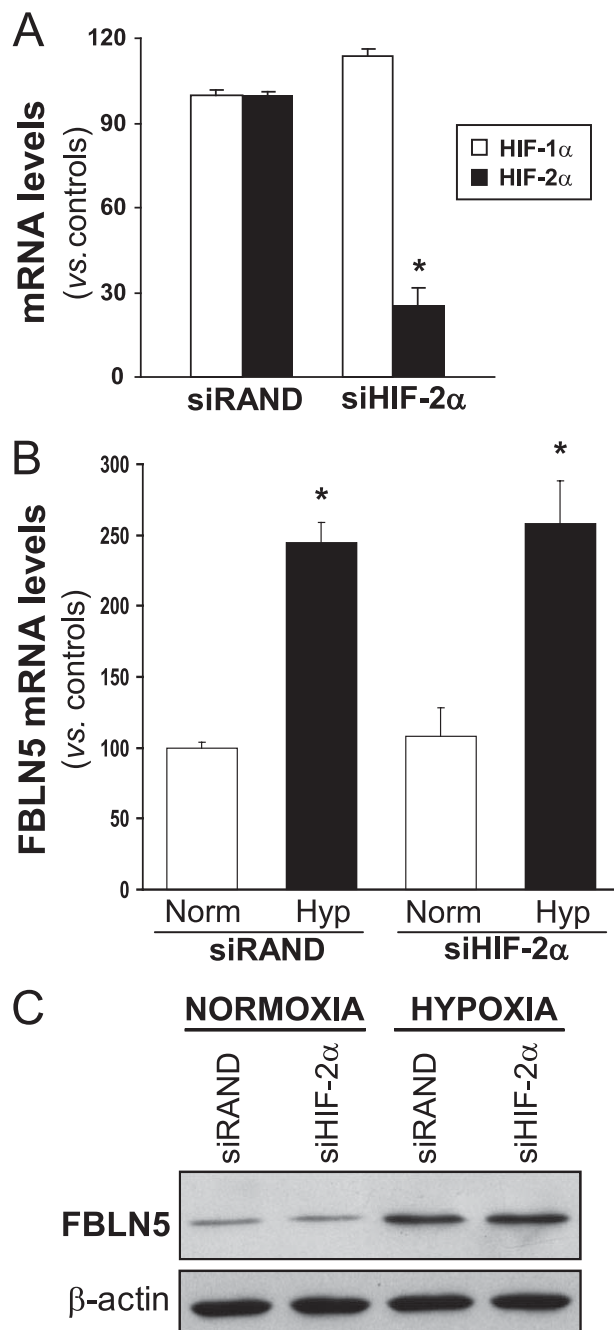


FIGURE 4. HIF-2 α silencing does not alter hypoxia-induced FBLN5 up-regulation. A, HIF-1 α and HIF-2 α mRNA levels, determined by real-time PCR, were analyzed in HUVEC transfected with a HIF-2 α -specific siRNA (siHIF-2 α) or a control siRNA (siRAND). Data are expressed as mean \pm S.E. ($n = 6$; *, $p < 0.05$ versus siRAND cells). HIF-2 α knockdown did not affect the up-regulation of FBLN5 mRNA (B) and protein levels (C) triggered by hypoxia (Norm, normoxia; Hyp, hypoxia). Results are expressed as mean \pm S.E. ($n = 6$; *, $p < 0.05$ versus normoxic cells transfected with a siRAND).

putative HRE located at -78 bp (Fig. 5C). To test the functionality of this motif, we used a site-directed mutagenesis approach. Fig. 5D shows that mutation of this HRE sequence completely abrogated the induction of FBLN5 promoter activity elicited by both hypoxia and HIF-1 α overexpression. Thus, these data suggest that the HRE site identified in our analysis confers FBLN5 hypoxia responsiveness.

HIF-1 α Binds to FBLN5 HRE Motif—To characterize the functionality of the putative HRE element described above,

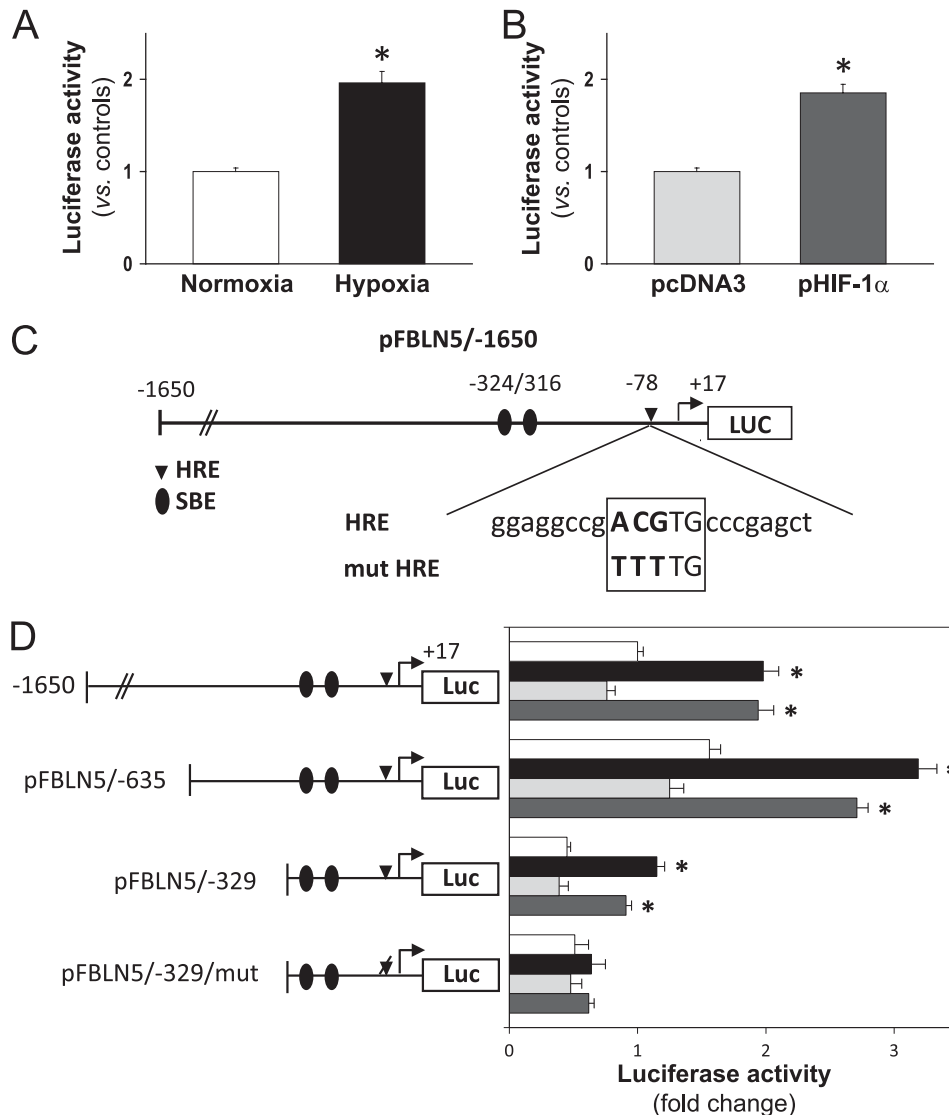


FIGURE 5. Hypoxia up-regulates *FBLN5* transcriptional activity through an HRE. *A*, BAEC transfected with the pFBLN5-1650 luciferase (*Luc*) construct were exposed to normoxia (white bars) or hypoxia (black bars) for 18 h. *B*, alternatively, cells maintained under normoxic conditions were co-transfected with an HIF-1 α expression vector (pHIF-1 α ; dark gray bars) or the corresponding empty vector (pcDNA3; light gray bars). Luciferase and β -galactosidase activities were determined as described under "Experimental Procedures." Results are expressed as mean \pm S.E. ($n = 9$). *C*, scheme corresponding to the *FBLN5* promoter region analyzed in transient transfection studies. The location of two Smad binding sites (SBE) and the sequence of the putative HRE motif are shown. Changes introduced by mutagenesis are indicated in **boldface**. *D*, a promoter serial deletion study was performed using the wild-type pFBLN5-1650, pFBLN5-635, and pFBLN5-329 luciferase constructs or the HRE-mutated vector pFBLN5-329/mut. Position of the wild-type HRE motif (indicated as a diamond) or its mutated form (indicated as a deleted diamond) are shown. Cells were cultured under normoxia (white bars) or hypoxia (black bars), co-transfected with a HIF-1 α expression vector (dark gray bars) or the corresponding empty vector (pcDNA3; light gray bars). Luciferase activity is expressed as fold change using pFBLN5-1650 (in normoxia) as a reference value. Results are expressed as mean \pm S.E. ($n = 9$; *, $p < 0.05$ versus normoxic or pcDNA3-transfected cells).

we performed EMSA assays. HeLa cells, rather than HUVEC, were used in these experiments because of their higher transfection efficiency by the liposome system used. HeLa cells were either subjected to hypoxia or transfected with a HIF-1 α expression vector (pHIF-1 α) or the corresponding empty vector (pcDNA3), and nuclear extracts were obtained. These extracts were used in binding reactions with 32 P end-labeled probes corresponding to the wild-type HRE (FBLN5-HRE) or its mutated form (FBLN5mut-HRE). Western blot assays verified that both hypoxia and HIF-1 α overexpression increased nuclear HIF-1 α protein levels (Fig. 6A). As shown in Fig. 6B, EMSA assays conducted with the wild-type HRE probe evidenced a pattern of two main retarded bands. Both hypoxia

and HIF-1 α overexpression enhanced the intensity of the upper-shifted band. In fact, the intensity of the upper retarded band in cells exposed to hypoxia or transfected with pHIF-1 α correlated with levels of HIF-1 α detected in these cells by Western blot (Fig. 6A). Conversely, mutation of the putative HRE element changed the pattern of shifted bands and abrogated the regulation caused by either hypoxia or HIF-1 α overexpression. The altered pattern of bands when mutated probes are used has been described previously with both HRE and non-HRE probes (36, 37) and could be derived from the partial and unspecific recognition of these sequences by nuclear proteins. Finally, an antibody against HIF-1 α strongly reduced the intensity of the upper shifted band suggesting the interac-

Hypoxia Induces FBLN5 Expression

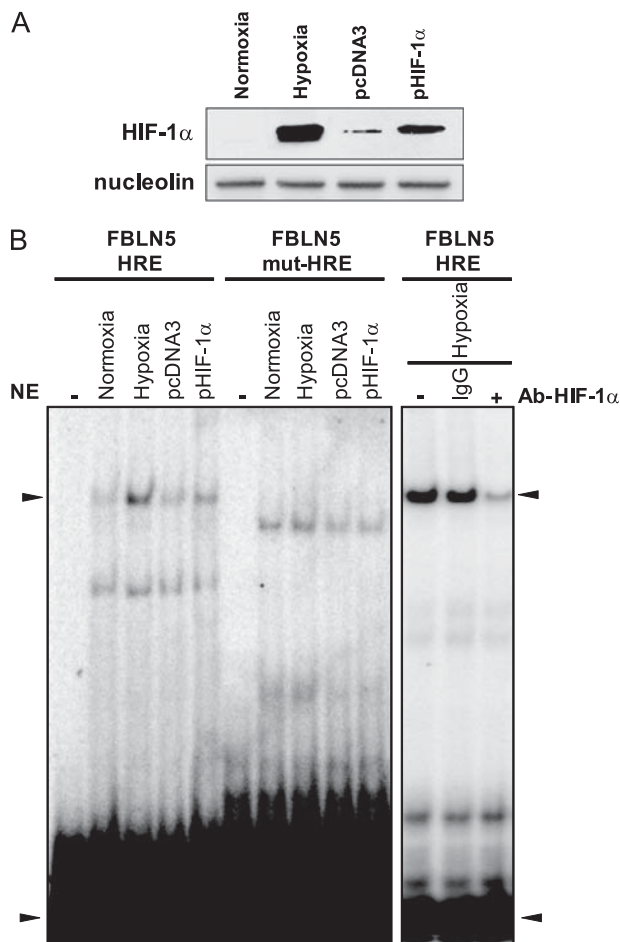


FIGURE 6. Hypoxia induces the binding of HIF-1 to an HRE in the *FBLN5* promoter. HeLa cells were subjected to hypoxic or normoxic conditions or co-transfected with a HIF-1 α expression vector (pHIF-1 α) or the empty vector (pcDNA3) and nuclear extracts were obtained. *A*, nuclear levels of HIF-1 α were determined by Western blot. Nucleolin levels were used as a loading control. *B*, the DNA binding activity of HIF-1 α was evaluated by EMSA using an oligonucleotide probe corresponding to the putative HRE binding site in the *FBLN5* promoter (FBLN5-HRE). The binding to this motif was prevented when the HRE site was mutated (FBLN5mut-HRE). Upon addition of a specific antibody against HIF-1 α (Ab-HIF-1 α), the intensity of the shifted band was strongly reduced. A nonspecific IgG was used as a control. The arrowheads indicate the position of the specific retarded band and the excess of free probe. A representative autoradiogram of two independent experiments is shown. NE, nuclear extracts.

tion of HIF-1 α with this sequence. These data indicate that hypoxia promotes the binding of HIF-1 to the HRE sequence present in the *FBLN5* promoter.

HIF-1 α Binds to *FBLN5* Promoter—To confirm that hypoxia promotes HIF-1 recruitment to the *FBLN5* promoter, ChIP assays were carried out. HUVEC were subjected to normoxic or hypoxic conditions, and chromatin immunoprecipitations were performed with a specific HIF-1 α antibody. Consistent with data from EMSA studies, results of ChIP analysis using primers flanking the *FBLN5* HRE site (–245/+59) revealed that hypoxia induced the recruitment of HIF-1 α to the *FBLN5* proximal promoter (Fig. 7*A*). The specificity of chromatin immunoprecipitation was confirmed by the absence of signal in the IgG control. Furthermore, preimmunoprecipitation samples evidenced equivalent DNA input (Fig. 7*B*). As a positive control, an increase in HIF-1 α recruitment to the

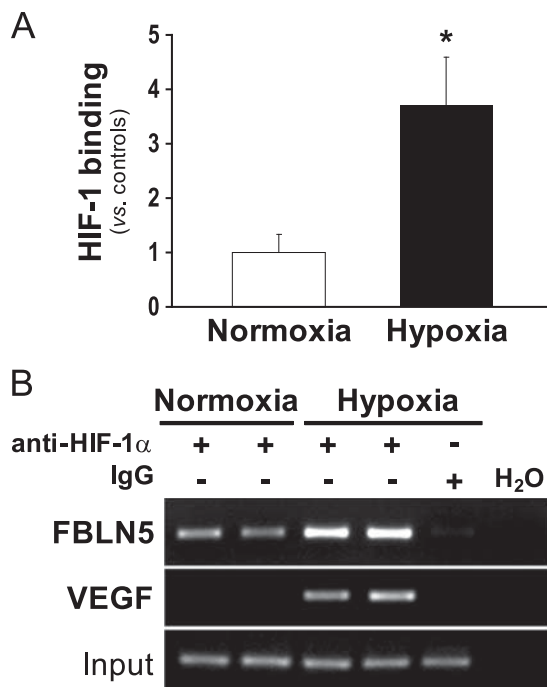


FIGURE 7. HIF-1 α binds to the *FBLN5* promoter in hypoxic cells. The relative *in vivo* association of HIF-1 α with the human *FBLN5* promoter was analyzed by ChIP in HUVEC incubated under normoxic or hypoxic conditions. Chromatin was sheared by sonication, and immunoprecipitations were performed with an anti-HIF-1 α antibody or a nonspecific goat IgG. *A*, the enrichment of HIF-1 α was quantified by real-time PCR using *FBLN5* promoter-specific primers. PCR reactions using total input DNA saved before immunoprecipitation and H₂O were also carried out. Data were normalized to the total input DNA and represented as mean \pm S.E. of two independent experiments performed in duplicate (*, $p < 0.05$ versus control cells). *B*, agarose gel electrophoresis of PCR products amplified using specific primers for both *FBLN5* and VEGF promoters. Equal input DNA and control IgG immunoprecipitations are shown.

VEGF promoter, a well known HIF-1 α target gene, was also observed in cells under hypoxic conditions (Fig. 7*B*). Overall, these results provide convincing evidence that the –78 sequence within the *FBLN5* proximal promoter functions as a HRE and is capable of conferring hypoxia-mediated regulation of *FBLN5* expression.

***FBLN5* Knockdown Potentiates Hypoxia-induced Apoptosis in Endothelial Cells**—We aimed to establish whether hypoxia-induced *FBLN5* up-regulation could be related to the survival response triggered by hypoxia in endothelial cells. HUVEC transfected with a siRNA against *FBLN5* (siFBLN5) or with a control siRNA (siRAND) were maintained under normoxic or hypoxic conditions and cells were stained with annexin V-FITC and PI to identify apoptotic cells. As we and others (4, 38) had described previously, HUVEC subjected to hypoxia show an increased apoptotic rate (evaluated by annexin V⁺ and PI staining) compared with normoxic cells. FACS analysis showed that the rate of endothelial cells undergoing apoptosis in cultures exposed to hypoxia increased in *FBLN5* knockdown cells (from 19.33 \pm 0.86% to 34.63 \pm 5.68%) (Fig. 8, *A* and *B*). A slight increase in apoptosis in cells maintained under normoxia was also observed. siFBLN5 efficiently inhibited *FBLN5* expression as confirmed by Western blot (Fig. 8*C*), immunofluorescence (Fig. 8*D*), and real-time PCR (Fig. 8*F*) without affecting *FBLN2* or *FBLN3* expression (Fig. 8*F*). The

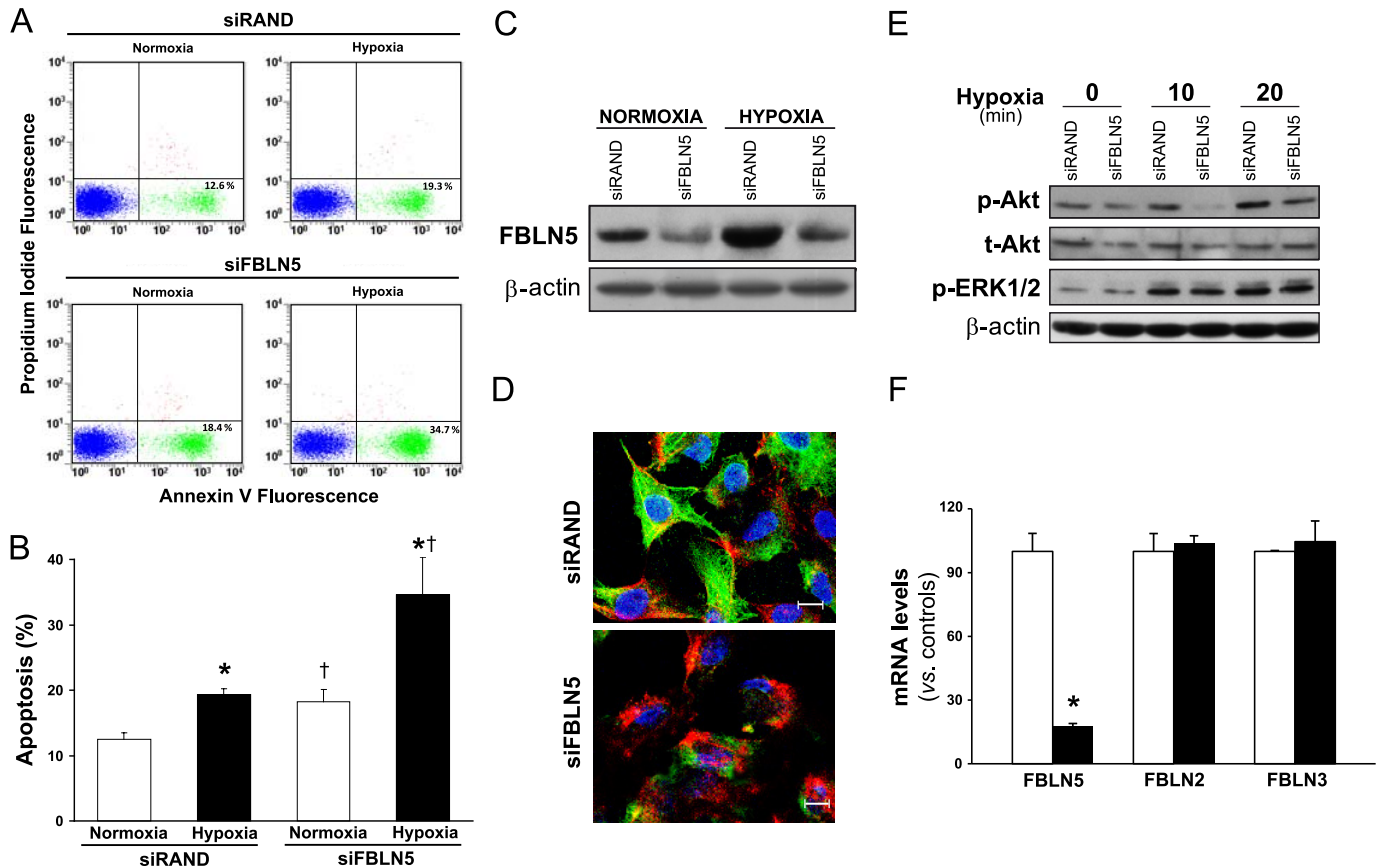


FIGURE 8. FBLN5 knockdown potentiates apoptosis under hypoxia. HUVEC were transfected with a FBLN5-specific siRNA (*siFBLN5*) or a control siRNA (*siRAND*) and exposed to normoxia or hypoxia during 24 h. Apoptosis was assessed by annexin V/propidium iodide staining and FACS analysis. *A*, representative FACS analyses corresponding to one experiment are shown. *B*, graphical representation showing the percentage of apoptotic cells under each experimental condition. Data are reported as mean \pm S.E. ($n = 9$; *, $p < 0.05$ versus cells transfected with the same siRNA and maintained in normoxia; †, versus cells transfected with *siRAND* and maintained under the same experimental condition). *C*, Western blot analysis demonstrate the efficiency of FBLN5 knockdown in both cells maintained under normoxia or exposed to hypoxia. *D*, representative confocal images showing FBLN5 staining (in green) from cells transfected with either *siRAND* or *siFBLN5* and exposed to hypoxia. Nuclei were stained with Hoechst (blue), and F-actin is visualized in red. Bar, 10 μ m. *E*, HUVEC were transfected with *siRAND* or *siFBLN5* for 48 h and were exposed to hypoxia for the indicated times. The effect of FBLN5 silencing on total Akt (*t-Akt*) and on the activation of Akt (*p-Akt*) and ERK1/2 (*p-ERK1/2*) was evaluated by Western blot. *F*, mRNA levels corresponding to FBLN2, FBLN3, and FBLN5 in HUVEC transfected with *siRAND* (white bars) or *siFBLN5* (black bars) were analyzed by real-time PCR ($n = 9$; *, $p < 0.05$ versus cells transfected with *siRAND*).

reduced survival response observed after FBLN5 knockdown was associated to a decrease in basal levels of both total and phosphorylated Akt and to a lesser activation of Akt under hypoxia. In these conditions, ERK1/2 activation remained unchanged (Fig. 8*E*). Altogether, our results indicate that hypoxia-induced FBLN5 expression seems to contribute to preserve endothelial cell survival.

DISCUSSION

FBLN5 is an ECM protein crucial for elastic fiber assembly. It serves as an organizer of elastogenesis that scaffolds elastic fiber components in the proximity of cell surface (11, 13, 39). This protein plays a key role in physiological processes such as tissue development, remodeling, and repair (10, 16, 40–42). Conversely, aberrant FBLN5 expression has been associated with several types of tumors (14) and pelvic organ prolapse (43). In addition, mutations in the *FBLN5* gene are related with macular degeneration and severe forms of cutis laxa (44, 45). Interestingly, FBLN5 acts as a multifunctional protein involved in cell-cell and matrix-cell signaling pathways key for vascular cell proliferation, adhesion, and migra-

tion (11, 15, 17, 46–48), as well as for vascular redox state (49, 50) and synthesis of ECM proteases (51, 52). Our current work demonstrates that hypoxic stress induces FBLN5 expression in vascular endothelial cells (human, bovine, or mouse endothelial cells), an effect that is extensive to other cell types. Furthermore, our results point to HIF-1 as responsible for FBLN5 regulation by hypoxia and identify *FBLN5* as a novel HIF-1 target gene. Interestingly, FBLN5 up-regulation seems to be part of the adaptive response of endothelial cells to survive to hypoxia.

The transcriptional response to hypoxia is primarily mediated by HIF transcription factors. Accordingly, our data show that inhibition of HIF prolyl hydroxylases (by dimethyl oxal glycine) and the consequent HIF-1 α stabilization (33), recapitulates the increase in *FBLN5* expression elicited by hypoxia in endothelial cells. The role of HIF-1 on FBLN5 regulation is further supported by data from HIF-1 α knockdown experiments and by the induction of *FBLN5* transcriptional activity elicited by HIF-1 α overexpression, which mimics that achieved by hypoxia. In addition, the inhibition of the PI3K/Akt/mTOR pathway, which is involved in the regulation of

Hypoxia Induces FBLN5 Expression

HIF-1 (6), prevented the induction of FBLN5 by hypoxia. Although HIF-2 α also mediates the adaptive response to hypoxia, its marginal induction in HUVEC exposed to hypoxia (see Fig. 3B) (34) and the fact that HIF-2 α silencing did not affect the hypoxia-mediated increase of FBLN5 expression support a major role of HIF-1 α on FBLN5 regulation.

Our serial deletion studies delimited hypoxia responsiveness to a proximal promoter region of 329 bp. *In silico* analysis of this sequence evidenced the presence of two Smad response elements reported previously (35) and, more interestingly, a putative HRE located at -78 . Although Smad proteins have been involved in the cellular response to hypoxia (53), mutation of the HRE site totally abrogated hypoxic FBLN5 induction. Accordingly, EMSA and ChIP data further support that this HRE motif located in the proximal FBLN5 promoter confers hypoxia sensitivity. As few studies have been focused on the characterization of the FBLN5 promoter, the HRE motif identified in our study is one of the few FBLN5 regulatory elements described so far.

FBLN5 is able to regulate processes in a tissue- and cell type-specific manner (47). Indeed, in vascular cells, FBLN5 differentially regulates cell proliferation and motility and ECM protease activity compared with other cells such as fibroblasts or fibrosarcoma cells (51, 52). The mechanism underlying these disparate effects is unknown, but it could be related with differences in the ECM environment or in the binding of FBLN5 to integrins. It should be noted that, although FBLN5 supports VSMC adhesion through integrins (15), it fails to activate integrin signaling (46). In fact, it has been recently proposed that FBLN5 could act as an “integrin antagonist,” a concept that opens up new expectations for FBLN5 as a critical regulator of cell homeostasis.

As described above, FBLN5 favors endothelial cell attachment to the ECM, contributing to preserve structural and functional characteristics of the endothelial cell monolayer (48). Furthermore, FBLN5 cooperates with FBLN2 to maintain the integrity of the adult vessel wall after injury and to avoid abnormal remodeling (54). Although hypoxia is a well established proangiogenic stimulus, FBLN5 exhibits antiangiogenic activities both *in vitro* and *in vivo* (18–20, 52). However, hypoxia should not be considered as a mere regulator of angiogenesis. Preliminary data suggest that FBLN5 could contribute to the hypoxia-induced increase in endothelial cell adhesion (data not shown) in agreement with previous reports (17). More interestingly, our data indicate that the up-regulation of FBLN5 expression in ischemic conditions is associated with the survival response of endothelial cells to hypoxia. Accordingly, fibroblasts harboring a defective FBLN5 form reported in recessive cutis laxa disease showed increased apoptosis compared with cells that express the wild-type FBLN5 form (55). The observation that prolonged blockade of FBLN5 results in a reduction of both total and hypoxia-induced phosphorylated Akt is consistent with a role of FBLN5 in cell survival, as activation of Akt is critical for cell survival to hypoxia (4, 56). The mechanisms underlying the prosurvival properties of FBLN5 remain complex and not well understood. Recently, it has been described that FBLN5 regulates reactive oxygen species production in endothelial cells (50). Further-

more, FBLN5 is able to activate integrin signaling, involved in cell survival (57, 58), although, as we mentioned above, in some scenarios, it has been postulated as an integrin antagonist. The reported antiapoptotic effect of FBLN5 could involve specific cell-type mechanisms, and the alteration of integrin expression and ECM composition elicited by hypoxia adds further complexity to ECM-cell signaling (59–61). As an integrin-binding ECM component, it is commonly accepted that the biological activity of FBLN5, is derived from its extracellular location. Zhou *et al.* (62) have recently described that FBLN5 binds and colocalizes with Nogo-B in both the cytosol and the cell surface of HeLa, thereby facilitating FBLN5 secretion; however, they neither analyzed whether FBLN5 could affect Nogo-B function nor attributed an “intracellular function” for FBLN5. Therefore, there is no evidence supporting a functional role for intracellular FBLN5. However, taking into account that the molecular mechanisms underlying the biology of FBLN5 remain to be fully elucidated and that hypoxia increases both intracellular and extracellular FBLN5 levels, we cannot rule out a role for intracellular FBLN5 in cell survival. Therefore, further studies will be necessary to clarify the mechanisms by which FBLN5 regulates endothelial cell survival. In summary, our study identifies FBLN5 as a new HIF-1 target gene involved in the orchestrated adaptive response of endothelial cells to hypoxic stress.

Acknowledgments—We are grateful to Dr. L. E. Huang for providing the HIF-1 α expression vector. We also thank Silvia Aguiló and Esther Peña for technical assistance.

REFERENCES

1. Semenza, G. L. (2000) *J. Clin. Invest.* **106**, 809–812
2. Pugh, C. W., and Ratcliffe, P. J. (2003) *Nat. Med.* **9**, 677–684
3. Economopoulou, M., Langer, H. F., Celeste, A., Orlova, V. V., Choi, E. Y., Ma, M., Vassilopoulos, A., Callen, E., Deng, C., Bassing, C. H., Boehm, M., Nussenzweig, A., and Chavakis, T. (2009) *Nat. Med.* **15**, 553–558
4. Martorell, L., Gentile, M., Rius, J., Rodríguez, C., Crespo, J., Badimon, L., and Martínez-González, J. (2009) *Mol. Cell. Biol.* **29**, 5828–5842
5. Safran, M., and Kaelin, W. G., Jr. (2003) *J. Clin. Invest.* **111**, 779–783
6. Semenza, G. L. (2009) *Physiology* **24**, 97–106
7. del Peso, L., Castellanos, M. C., Temes, E., Martin-Puig, S., Cuevas, Y., Olmos, G., and Landazuri, M. O. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 48690–48695
8. Tang, N., Wang, L., Esko, J., Giordano, F. J., Huang, Y., Gerber, H. P., Ferrara, N., and Johnson, R. S. (2004) *Cancer Cell* **6**, 485–495
9. Choi, J., Bergdahl, A., Zheng, Q., Starcher, B., Yanagisawa, H., and Davis, E. C. (2009) *Matrix Biol.* **28**, 211–220
10. Kowal, R. C., Richardson, J. A., Miano, J. M., and Olson, E. N. (1999) *Circ. Res.* **84**, 1166–1176
11. Nakamura, T., Lozano, P. R., Ikeda, Y., Iwanaga, Y., Hinek, A., Minamisawa, S., Cheng, C. F., Kobuke, K., Dalton, N., Takada, Y., Tashiro, K., Ross Jr., J., Honjo, T., and Chien, K. R. (2002) *Nature* **415**, 171–175
12. Nonaka, R., Onoue, S., Wachi, H., Sato, F., Urban, Z., Starcher, B. C., and Seyama, Y. (2009) *Clin. Biochem.* **42**, 713–721
13. Yanagisawa, H., Davis, E. C., Starcher, B. C., Ouchi, T., Yanagisawa, M., Richardson, J. A., and Olson, E. N. (2002) *Nature* **415**, 168–171
14. Albig, A. R., and Schiemann, W. P. (2005) *Future Oncol.* **1**, 23–35
15. Nakamura, T., Ruiz-Lozano, P., Lindner, V., Yabe, D., Taniwaki, M., Furukawa, Y., Kobuke, K., Tashiro, K., Lu, Z., Andon, N. L., Schaub, R., Matsumori, A., Sasayama, S., Chien, K. R., and Honjo, T. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 22476–22483

16. Spencer, J. A., Hacker, S. L., Davis, E. C., Mecham, R. P., Knutsen, R. H., Li, D. Y., Gerard, R. D., Richardson, J. A., Olson, E. N., and Yanagisawa, H. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 2946–2951
17. Preis, M., Cohen, T., Sarnatzki, Y., Ben Yosef, Y., Schneiderman, J., Gluzman, Z., Koren, B., Lewis, B. S., Shaul, Y., and Flugelman, M. Y. (2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **348**, 1024–1033
18. Xie, L., Palmsten, K., MacDonald, B., Kieran, M. W., Potenta, S., Vong, S., and Kalluri, R. (2008) *Exp. Biol. Med.* **233**, 155–162
19. Albig, A. R., and Schiemann, W. P. (2004) *DNA Cell Biol.* **23**, 367–379
20. Sullivan, K. M., Bissonnette, R., Yanagisawa, H., Hussain, S. N., and Davis, E. C. (2007) *Lab. Invest.* **87**, 818–827
21. Rodríguez, C., Alcudia, J. F., Martínez-González, J., Guadall, A., Raposo, B., Sánchez-Gómez, S., and Badimon, L. (2009) *Cardiovasc. Res.* **83**, 595–603
22. Rodríguez, C., Alcudia, J. F., Martínez-González, J., Raposo, B., Navarro, M. A., and Badimon, L. (2008) *Atherosclerosis* **196**, 558–564
23. Orbe, J., Rodríguez, J. A., Calvayrac, O., Rodríguez-Calvo, R., Rodríguez, C., Roncal, C., Martínez de Lizarrondo, S., Barrenetxe, J., Reverter, J. C., Martínez-González, J., and Páramo, J. A. (2009) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **29**, 2109–2116
24. Martorell, L., Martínez-González, J., Crespo, J., Calvayrac, O., and Badimon, L. (2007) *J. Thromb. Haemost.* **5**, 1766–1773
25. Raposo, B., Rodríguez, C., Martínez-González, J., and Badimon, L. (2004) *Atherosclerosis* **177**, 1–8
26. Huang, L. E., Gu, J., Schau, M., and Bunn, H. F. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 7987–7992
27. Rius, J., Martínez-González, J., Crespo, J., and Badimon, L. (2006) *Atherosclerosis* **184**, 276–282
28. González-Díez, M., Rodríguez, C., Badimon, L., and Martínez-González, J. (2008) *Thromb. Haemost.* **100**, 119–126
29. Rodríguez, C., Raposo, B., Martínez-González, J., Llorente-Cortés, V., Vilahur, G., and Badimon, L. (2003) *Cardiovasc. Res.* **58**, 178–185
30. Martínez-González, J., Rodríguez-Rodríguez, R., González-Díez, M., Rodríguez, C., Herrera, M. D., Ruiz-Gutierrez, V., and Badimon, L. (2008) *J. Nutr.* **138**, 443–448
31. Martínez-González, J., Escudero, I., and Badimon, L. (2004) *Atherosclerosis* **174**, 305–313
32. Abedin, S. A., Thorne, J. L., Battaglia, S., Maguire, O., Hornung, L. B., Doherty, A. P., Mills, I. G., and Campbell, M. J. (2009) *Carcinogenesis* **30**, 449–456
33. Jaakkola, P., Mole, D. R., Tian, Y. M., Wilson, M. I., Gielbert, J., Gaskell, S. J., Kriegsheim, A., Hebestreit, H. F., Mukherji, M., Schofield, C. J., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., and Ratcliffe, P. J. (2001) *Science* **292**, 468–472
34. Hu, C. J., Wang, L. Y., Chodosh, L. A., Keith, B., and Simon, M. C. (2003) *Mol. Cell. Biol.* **23**, 9361–9374
35. Kuang, P. P., Joyce-Brady, M., Zhang, X. H., Jean, J. C., and Goldstein, R. H. (2006) *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **291**, C1412–C1421
36. Luo, Y., Jiang, C., Belanger, A. J., Akita, G. Y., Wadsworth, S. C., Gregory, R. J., and Vincent, K. A. (2006) *Mol. Pharmacol.* **69**, 1953–1962
37. Wolf, D., Cammas, F., Losson, R., and Goff, S. P. (2008) *J. Virol.* **82**, 4675–4679
38. Madge, L. A., and Pober, J. S. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 15458–15465
39. Hirai, M., Ohbayashi, T., Horiguchi, M., Okawa, K., Hagiwara, A., Chien, K. R., Kita, T., and Nakamura, T. (2007) *J. Cell Biol.* **176**, 1061–1071
40. Jean, J. C., Eruchalu, I., Cao, Y. X., and Joyce-Brady, M. (2002) *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **282**, L75–82
41. Kuang, P. P., Goldstein, R. H., Liu, Y., Rishikof, D. C., Jean, J. C., and Joyce-Brady, M. (2003) *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **285**, L1147–L1152
42. Lee, M. J., Roy, N. K., Mogford, J. E., Schiemann, W. P., and Mustoe, T. A. (2004) *J. Am. Coll. Surg.* **199**, 403–410
43. Söderberg, M. W., Byström, B., Kalamajski, S., Malmström, A., and Ekman-Ordeberg, G. (2009) *Mol. Hum. Reprod.* **15**, 251–257
44. Loeys, B., Van Maldergem, L., Mortier, G., Coucke, P., Gerniers, S., Naeyaert, J. M., and De Paepe, A. (2002) *Hum. Mol. Genet.* **11**, 2113–2118
45. Stone, E. M., Braun, T. A., Russell, S. R., Kuehn, M. H., Lotery, A. J., Moore, P. A., Eastman, C. G., Casavant, T. L., and Sheffield, V. C. (2004) *N. Engl. J. Med.* **351**, 346–353
46. Lomas, A. C., Mellody, K. T., Freeman, L. J., Bax, D. V., Shuttleworth, C. A., and Kilty, C. M. (2007) *Biochem. J.* **405**, 417–428
47. Schiemann, W. P., Blobbe, G. C., Kalume, D. E., Pandey, A., and Lodish, H. F. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 27367–27377
48. Williamson, M. R., Shuttleworth, A., Canfield, A. E., Black, R. A., and Kilty, C. M. (2007) *Biomaterials* **28**, 5307–5318
49. Nguyen, A. D., Itoh, S., Jeney, V., Yanagisawa, H., Fujimoto, M., Ushio-Fukai, M., and Fukai, T. (2004) *Circ. Res.* **95**, 1067–1074
50. Schluterman, M. K., Chapman, S. L., Korpanty, G., Ozumi, K., Fukai, T., Yanagisawa, H., and Brekken, R. A. (2010) *Dis. Model Mech.* **3**, 333–342
51. Lee, Y. H., Albig, A. R., Regner, M., Schiemann, B. J., and Schiemann, W. P. (2008) *Carcinogenesis* **29**, 2243–2251
52. Albig, A. R., Neil, J. R., and Schiemann, W. P. (2006) *Cancer Res.* **66**, 2621–2629
53. Zhang, H., Akman, H. O., Smith, E. L., Zhao, J., Murphy-Ullrich, J. E., and Batuman, O. A. (2003) *Blood* **101**, 2253–2260
54. Chapman, S. L., Sicot, F. X., Davis, E. C., Huang, J., Sasaki, T., Chu, M. L., and Yanagisawa, H. (2010) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30**, 68–74
55. Hu, Q., Loeys, B. L., Coucke, P. J., De Paepe, A., Mecham, R. P., Choi, J., Davis, E. C., and Urban, Z. (2006) *Hum. Mol. Genet.* **15**, 3379–3386
56. Alvarez-Tejado, M., Naranjo-Suarez, S., Jiménez, C., Carrera, A. C., Landázuri, M. O., and del Peso, L. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 22368–22374
57. Yue, W., Sun, Q., Landreneau, R., Wu, C., Siegfried, J. M., Yu, J., and Zhang, L. (2009) *Cancer Res.* **69**, 6339–6346
58. Avraamides, C. J., Garmy-Susini, B., and Varner, J. A. (2008) *Nat. Rev. Cancer* **8**, 604–617
59. Rohwer, N., Welzel, M., Daskalow, K., Pfander, D., Wiedenmann, B., Detjen, K., and Cramer, T. (2008) *Cancer Res.* **68**, 10113–10120
60. Ryu, M. H., Park, H. M., Chung, J., Lee, C. H., and Park, H. R. (2010) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **393**, 11–15
61. Walton, H. L., Corjay, M. H., Mohamed, S. N., Mousa, S. A., Santomenna, L. D., and Reilly, T. M. (2000) *J. Cell. Biochem.* **78**, 674–680
62. Zhou, S., Xiao, W., Wan, Q., Yi, C., Xiao, F., Liu, Y., and Qi, Y. (2010) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **398**, 247–253