

Aus der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Malte Kelm

**Die Induktion von Atherosklerose-assoziierten Genen
in der Maus-Arterie durch oxidierte Phospholipide**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Alexander Fürnkranz

2020

Als Inaugurationsdissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Malte Kelm

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Artur Lichtenberg

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Fürnkranz, A., Schober, A., Bochkov, V. N., Bashtrykov, P., Krönke, G., Kadl,
A., Binder, B.R., Weber, C., Leitinger, N., (2005), Oxidized Phospholipids
Trigger Atherogenic Inflammation in Murine Arteries. Arterioscler Thromb Vasc
Biol., (25) 633 – 638

Zusammenfassung

Oxidationsprodukte von 1-palmitoyl- 2-arachidonoyl-sn-3-glycero-phosphorylcholin (OxPAPC) entstehen in der Initialphase der Lipoprotein-Oxidation und wurden in atherosklerotischen Läsionen nachgewiesen. Umfangreiche *in-vitro* Studien weisen auf die pathogenetische Rolle biologisch aktiver Phospholipide in der frühen Atherosklerose hin. Bislang gab es jedoch kein *in-vivo* Modell, welches erlaubt, direkt die Wirkungen oxidierter Phospholipide auf die Gefäßwand zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit wurde daher ein Tiermodell entwickelt, welches ermöglicht, OxPAPC direkt an arterielle Gefäße zu applizieren. Mittels quantitativer Echtzeit-PCR (*polymerase chain reaction*) und Immunhistochemie konnte nachgewiesen werden, dass OxPAPC eine Reihe Atherosklerose-assoziiierter Gene in der Gefäßwand induziert. Dies umfasste Chemokine wie *Monocyte chemotactic protein 1* (MCP-1) und *Keratinocyte-derived chemokine* (KC), sowie *Tissue factor* (TF), Interleukin-6 (IL-6), Hemoxygenase 1 (HO-1) und *Early growth response gene 1* (EGR-1). Eine erhöhte Expression OxPAPC-induzierter Chemokine konnte auch in atherosklerotischen Arterien von Apolipoprotein-B Knockout-Mäusen im Vergleich zu Wildtypmäusen gefunden werden. In einem ex-vivo Perfusionsmodell konnte gezeigt werden, dass OxPAPC, nicht aber unoxidiertes PAPC, die feste Adhärenz von Monozyten an das Endothel induziert. Diese Adhärenz wurde durch das Chemokin KC vermittelt. Der festen Adhärenz ging eine Phase des Monozyten-„Rollens“ voraus, welches durch P-Selektin vermittelt wurde. Dies repliziert die funktionellen Rollen von KC und P-Selektin in atherosklerotischen Arterien in hyperlipidämischen Mausmodellen. Zusammengefaßt wurde gezeigt, dass oxidierte Phospholipide *in-vivo* eine für Atherosklerose typische proinflammatorische Geninduktion in der Gefäßwand hervorrufen. Funktionell konnte KC, ein Interleukin-8 Homolog, als das wesentliche Arrest-Chemokin bei der Rekrutierung von Monozyten an das Gefäßendothel durch Ox-PAPC identifiziert werden. Dies stützt die Hypothese, dass oxidierten Phospholipiden eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose zukommt.

Summary

Lipoprotein-derived phospholipid oxidation products have been implicated as candidate triggers of the inflammatory process in atherosclerosis. However, in vivo evidence regarding the impact of oxidized phospholipids on the artery wall thus far has been elusive. Therefore, the aim of this study was to investigate if structurally defined oxidized phospholipids induce expression of atherogenic chemokines and monocyte adhesion in intact murine arteries. To model the accumulation of oxidized phospholipids in the arterial wall, oxidized 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-3-glycero-phosphorylcholine (OxPAPC) was topically applied to carotid arteries in mice using pluronic gel. Using quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction and immunohistochemistry, we show that OxPAPC induced a set of atherosclerosis-related genes, including monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) and keratinocyte-derived chemokine (KC), tissue factor (TF), interleukin 6 (IL-6), heme oxygenase 1 (HO-1), and early growth response gene 1 (EGR-1). OxPAPC-regulated chemokines were also expressed in atherosclerotic lesions of apolipoprotein E-deficient (ApoE^{-/-}) mice. In isolated perfused carotid arteries, OxPAPC triggered rolling and firm adhesion of monocytes in a P-selectin and KC-dependent manner. In conclusion, oxidized phospholipids contribute to vascular inflammation in murine arteries in vivo, initiating atherogenic chemokine expression that leads to monocyte adhesion. This supports the hypothesis that oxidized phospholipids are important triggers of the inflammatory process in atherosclerosis.

Abkürzungsverzeichnis

ApoB	Apolipoprotein-B
CS-1-FN	CS-1 Splice-Variante von Fibronektin
EGR-1	Early growth response gene-1
HDL	High density-Lipoprotein
HO-1	Hämoxygenase-1
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1
IDL	Intermediate density-Lipoprotein
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
KC	Keratinocyte-derived chemokine
LDL	Low density-Lipoprotein
LFA-1	Monocyte lymphocyte function-associated antigen 1
LPS	Lipopolysaccharid
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
MCP-1	Monocyte chemotactic protein 1
MIP-1α	Macrophage inflammatory protein 1 α
MM-LDL	Minimal modifiziertes LDL
Ox-PAPC	Oxidiertes PAPC
oxLDL	Hochgradig oxidiertes LDL
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
PAPC	1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholin
PCR	Reverse-transcriptase polymerase chain reaction
PDGF	Platelet derived growth factor
PEIPC	1-Palmitoyl-2-(5,6-epoxyisoprostan E2)-sn-glycero-3-phosphorylcholin
PGPC	1-Palmitoyl-2-glutaroyl-sn-glycero-3-phosphorylcholin
POVPC	1-Palmitoyl-2-(5-oxovaleroyl)-sn-glycero-3-phosphorylcholin
PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand-1
RANTES	Regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted
SDF-1	Stromal cell-derived factor 1
SR-A	Scavenger Rezeptor-A
TF	Tissue factor

TLR	Toll-like Rezeptor
VCAM-1	Vascular adhesion molecule 1
VLA-4	Monocyte very late antigen 4
VLDL	Very low density-Lipoprotein

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Pathologie der Atherosklerose	1
1.2	Das Apolipoprotein E-Knockout Mausmodell	3
1.3	Lipoprotein-Oxidation	4
1.3.1	Minimal und hochgradig oxidiertes LDL	4
1.4	Oxidierte Phospholipide vermitteln die Wirkung von MM-LDL	5
1.4.1	Rezeptoren für oxidierte Phospholipide	6
1.5	Die Rolle von Chemokinen in der Atherosklerose	7
1.6	Ziele der Arbeit	8
2	Oxidized Phospholipids Trigger Atherogenic Inflammation in Murine Arteries, Fürnkranz, A., Schober, A., Bochkov, V. N., Bashtrykov, P., Krönke, G., Kadl, A., Binder, B.R., Weber, C., Leitinger, N., Arterioscler Thromb Vasc Biol., 25: 633 – 638 (2005)	10
2.1	Supplement	17
3	Diskussion	21
3.1	Das Pluronic Mausmodell	21
3.2	Induktion von Chemokinen durch Ox-PAPC	21
3.3	Arterielle Chemokin-Expression in der ApoE-Knockout Maus	23
3.4	Ox-PAPC-induzierte Endothel-Monozyten-Interaktion	23
3.5	Induktion weiterer Atherosklerose-assoziiierter Gene durch Ox-PAPC	25
3.5.1	Tissue factor und EGR-1	25
3.5.2	Interleukin-6	26
3.5.3	Hämoxygenase-1	27
3.6	Ox-PAPC- versus LPS-induzierte Inflammation	28
3.7	Schlussfolgerungen	28
4	Literaturverzeichnis	30

1 Einleitung

Atherosklerose ist eine chronisch progrediente Erkrankung der arteriellen Gefäßwand, welche zu Stenosen bzw. akuten Verschlüssen der betroffenen Gefäßabschnitte führen kann. Klinisch manifestiert sich dies unter anderem als ischämische Herzerkrankung oder Schlaganfall. Die überwiegend auf Atherosklerose zurückzuführenden kardiovaskulären Erkrankungen sind zusammengenommen die führende Todesursache in Europa, mit 1,8 Millionen jährlichen Todesfällen, entsprechend 40% der Gesamtmortalität bei Männern, und 2,1 Millionen jährlichen Todesfällen, entsprechend 49% der Gesamtmortalität bei Frauen (1).

1.1 Pathologie der Atherosklerose

In dem ursprünglich als „Response-to-injury“ formulierten pathogenetischen Modell der Atherogenese (2) kommt es als Folge von Risikofaktoren wie Dyslipidämie oder arterieller Hypertonie zur endothelialen Dysfunktion insbesondere an Prädilektionsstellen wie Gefäßverzweigungen mit gestörtem laminarem Blutfluss. Dies führt unter anderem zu einer erhöhten Permeabilität für Lipoproteine, insbesondere von *LDL (low-density lipoproteins)*, welche in der extrazellulären Matrix akkumulieren (3,4). Umfassende Studiendaten deuten darauf hin, dass die subendotheliale Retention von Apolipoprotein-B (ApoB)-enthaltenden Lipoproteinen und deren anschließende biochemische Modifikation einen Schlüsselprozess in der Atherogenese darstellen (5). Umgekehrt basiert die effektivste prophylaktische Therapie atherosklerotischer Erkrankungen, die Senkung des LDL-Plasmaspiegels, auf einer Reduktion der subendothelialen Retention ApoB-haltiger Lipoproteine (5). Analog zu der Annahme einer ursprünglichen Endothelschädigung wurde dies in der „Response-to-retention“-Hypothese zusammengefasst (6). Die Komponenten der extrazellulären Matrix an arteriellen Prädilektionsstellen unterscheiden sich von solchen nicht betroffener Gefäßabschnitte (5) und sind durch eine höhere Konzentration von Proteoglykanen mit Chondroitinsulfat-Seitenketten

gekennzeichnet (7,8). Eine wesentliche Rolle bei der Lipoprotein-Retention spielt die Interaktion positiv geladener Domänen von ApoB mit negativ geladenen Sulfat-Gruppen der Proteoglykane (8).

In der subendothelialen Matrix sequestrierte Lipoproteine unterliegen biochemischen Modifikationen wie Oxidation, Lipolyse, Proteolyse und Aggregation (3). Eine Vielzahl von Studien deutet auf die wesentliche Rolle von Lipoprotein-Oxidationsprodukten bei der Vermittlung der folgenden pathogenetischen Schritte der Atherosklerose hin (Oxidations-Hypothese) (9). Diese bestehen in der endothelialen Adhärenz und Migration von Monozyten in die Intima welche zu Makrophagen differenzieren und modifizierte LDL aufnehmen. Dies erfolgt über *Scavenger* Rezeptoren, welche nicht über den intrazellulären Cholesteringehalt reguliert werden (10). Dadurch entstehen mit Lipiden angereicherte Makrophagen (Schaumzellen). Histopathologisch entspricht dieses Frühstadium dem *Fatty streak*, einer subendothelialen Akkumulation von Schaumzellen (11). *Fatty streaks* sind subklinische Formen der Atherosklerose, welche zu komplexen und klinisch manifesten Läsionen fortschreiten können. Diese Entwicklung umfasst die Anreicherung von apoptotischen Schaumzellen und Zellresten sowie von Lipiden, welche einen nekrotischen Kern in der Läsion bilden. Die häufigste Ursache für Zellnekrose in fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsionen ist die sekundäre Nekrose aufgrund einer ineffizienten Abräumung, oder Efferozytose, apoptotischer Schaumzellen, was eine Entzündungsreaktion nach sich zieht (12). Hierdurch werden wiederum modifizierte Lipide freigesetzt und durch weitere Makrophagen aufgenommen, was in einem *Circulus vitiosus* den pathologischen Prozess in Gang hält. Entsprechend konnte für die *Scavenger* Rezeptoren CD36 und *Scavenger* Rezeptor-A (SR-A) im Apolipoprotein E-Doppelknockout-Mausmodell eine Reduktion der Atherosklerose nachgewiesen werden (13,14).

Aus der Tunica media eingewanderte glatte Gefäßmuskelzellen und die von diesen gebildete extrazelluläre Matrix bilden eine fibröse Kappe über der atherosklerotischen Plaque. Eine progressive Lumeneinengung kann hierdurch zur klinisch manifesten Ischämie in den abhängigen Perfusionsarealen führen.

Eine dünne fibröse Kappe sowie ein vermehrtes Makrophagen-dominiertes entzündliches Infiltrat sind typische Merkmale einer Läsion mit Plaque-Ruptur. Eine Ruptur der fibrösen Kappe führt zum Kontakt thrombogenen Materials des nekrotischen Kerns mit dem zirkulierenden Blut und Thrombenbildung, was einen akuten Gefäßverschluss nach sich ziehen kann. Hierbei spielt die Produktion von *Tissue factor* (TF), einem Schlüsselprotein in der Initiierung der Koagulationskaskade, durch Endothelzellen und Makrophagen eine entscheidende Rolle (3).

1.2 Das Apolipoprotein E-Knockout Mausmodell

Apolipoprotein E (ApoE) vermittelt die hepatische Aufnahme von *Very Low Density*- (VLDL) und *Intermediate Density*-Lipoproteinen (IDL), sowie von Chylomikronen-*Remnants* (15). Wildtyp-Mäuse unter regulärer „Chow“-Diät weisen Cholesterin Plasma-Spiegel um 80 mg/dl auf, wobei dieses Cholesterin hauptsächlich in *High Density*-Lipoproteinen (HDL) transportiert wird (16). ApoE-Knockout Mäuse weisen demgegenüber eine ausgeprägte Hypercholesterinämie auf. Unter „Chow“-Diät betragen die Cholesterin-Plasmaspiegel um 500 mg/dl, wobei das Cholesterin hauptsächlich in den VLDL, IDL und LDL-Fractionen transportiert wird (15). Atherosklerotische Veränderungen sind bei diesen Tieren ab einem Alter von 10 Wochen nachweisbar (17). Hierbei geht der Läsionsbildung eine Phase der Monozyten-Adhärenz voraus, wobei sich nachfolgend an den selben anatomischen Loci typische *Fatty streak*-Läsionen ausbilden (17). Diese Läsionen entwickeln sich durch Rekrutierung glatter Gefäßmuskelzellen und Ablagerung von Bindegewebsmatrix zu fibrösen Plaques fort. Atherosklerotische Veränderungen bilden sich bei diesen Tieren in der Aortenwurzel, entlang der thorakalen und abdominalen Aorta, sowie in den Koronararterien, der Arteria carotis und den Pulmonalarterien aus (15,17). Unter einer fettreichen „*Western type*“-Diät treten die Läsionen früher und großflächiger auf. Aufgrund vieler Ähnlichkeiten zur humanen Atherosklerose ist die ApoE-Knockout Maus ein etabliertes Modell zum Studium dieser Erkrankung (18).

1.3 Lipoprotein-Oxidation

LDL ist ein Komplex aus einem Apolipoprotein B100, Cholesterinestern, freiem Cholesterin, Triglyceriden, lipophilen Antioxidantien, sowie einer einschichtigen Hülle aus Phospholipiden, hauptsächlich Phosphatidylcholin (19). In Zellkultur-Studien wurde gezeigt, dass Endothelzellen und glatte Gefäßmuskelzellen LDL oxidieren können (20). Die Lipid-Oxidation in der Gefäßwand wird durch Abschirmung von Antioxidantien im Blutplasma begünstigt (10,21). Als Mechanismen werden zelluläre Lipoxygenasen, insbesondere die 12/15-Lipoxygenase, oder von den Gefäßwandzellen sezernierte reaktive Sauerstoffspezies angenommen (22). Entsprechend konnte im ApoE-Knockout Mausmodell gezeigt werden, dass ein zusätzlicher Gen-Knockout der 12/15-Lipoxygenase zu verminderter Atherosklerose führt (23).

1.3.1 Minimal und hochgradig oxidiertes LDL

Basierend auf den Ergebnissen von *in-vitro* Studien wird angenommen, dass die oxidative Modifikation von LDL in Stadien verläuft. Dem Frühstadium entspricht minimal modifiziertes LDL (MM-LDL), welches einen Verlust lipophiler Antioxidantien sowie die Oxidation Arachidonsäure-haltiger Phospholipide der LDL-Oberfläche bei minimaler Proteinmodifikation aufweist (24). MM-LDL enthalten keine Liganden für die *Scavenger*-Rezeptoren von Makrophagen. MM-LDL können durch Inkubation nativer LDL mit Ko-Kulturen aus Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen gewonnen werden (20). Es wird daher angenommen, dass die Bildung von MM-LDL vor der Rekrutierung von Makrophagen in die Gefäßwand erfolgt (10). MM-LDL weist eine spezifische biologische Aktivität auf, welche auf eine Rolle in der initialen Rekrutierung von Monozyten in der Frühatherogenese hinweist. Insbesondere induziert MM-LDL die Bindung von Monozyten, jedoch nicht von Granulozyten, an Endothelzellen (25). Darüber hinaus induziert MM-LDL *monocyte chemotactic protein 1* (MCP-1) in Endothel- und glatten Gefäßmuskelzellen (26), sowie *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) in Endothelzellen (27). M-CSF stimuliert die Proliferation und Differenzierung von Makrophagen, sowie die Expression von *Scavenger* Rezeptoren. Mäuse mit einer spontanen Null-Mutation im M-CSF-

Gen zeigen im ApoE-Knockout Mausmodell eine stark verringerte Atherosklerose der proximalen Aorta (28), was auf eine wesentliche Rolle von M-CSF in der Atherogenese hinweist.

Mit dem Einwandern von Monozyten und deren Differenzierung in Makrophagen schreitet der oxidative Prozess fort und es entsteht hochgradig oxidiertes LDL (oxLDL), welches Endprodukte der Lipidoxidation wie Malondialdehyd und 4-Hydroxynonenal enthält (24). Diese Substanzen gehen kovalente Bindungen mit Lysinresten von ApoB ein, wodurch oxLDL durch *Scavenger* Rezeptoren von Makrophagen erkannt und aufgenommen werden können (22).

1.4 Oxidierte Phospholipide vermitteln die Wirkung von MM-LDL

Die biologische Aktivität von MM-LDL, die Bindung von Monozyten an Endothelzellen zu induzieren, konnte auf die Phospholipid-Fraktion zurückgeführt werden (29). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass biologisch aktive Phospholipide in MM-LDL Oxidationsprodukten von Arachidonsäurehaltigem Phosphatidylcholin entsprechen, genauer 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholin (PAPC) (20).

Im Einzelnen konnten 3 Verbindungen strukturell identifiziert werden (24,30):

- 1-Palmitoyl-2-(5-oxovaleroyl)-sn-glycero-3-phosphorylcholin (POVPC)
- 1-Palmitoyl-2-glutaroyl-sn-glycero-3-phosphorylcholin (PGPC)
- 1-Palmitoyl-2-(5,6-epoxyisoprostan E2)-sn-glycero-3-phosphorylcholin (PEIPC)

Diese Verbindungen wurden *in-vivo* in aortalen *Fatty streak* Läsionen von Kaninchen unter atherogener Diät nachgewiesen (24). Die Gewebskonzentrationen betrugen hierbei 116, 62 und 85 µg/ml für POVPC, PGPC bzw. PEIPC, was dem über 10-fachem jener Konzentration entspricht, welche zur

Aktivierung von Endothelzellen *in-vitro* erforderlich ist (31). Eine Mischung identischer Verbindungen erhält man durch die Oxidation von PAPC (Ox-PAPC) sodass Ox-PAPC als Surrogat für MM-LDL eingesetzt werden kann (24).

Die biologische Wirkung dieser Verbindungen wird durch die Molekularstruktur an der sn-2 Position bestimmt. Ein Wechsel von Palmitat zu Stearat an der sn-1 Position, oder ein Wechsel der polaren Kopfgruppe von Phosphorylcholin zu Phosphorylethanolamin beeinflusst nicht die dosisabhängige Wirkung in Monozyten-Endothel-Bindungsversuchen (31). Bezogen auf äquimolare Konzentrationen ist PEIPC 10-fach wirksamer als PGPC oder POVPC (30). Für PGPC wurde als einzige Substanz auch eine E-Selectin-abhängige Bindung von neutrophilen Granulozyten an Endothelzellen *in-vitro* nachgewiesen, dies wird jedoch von POVPC gehemmt (32). Ox-PAPC, welches POVPC und PGPC zu gleichen Anteilen enthält, weist daher eine Monozyten-spezifische Wirkung in der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion auf (32). Diese *in-vitro* Daten aus statischen Ko-Kultursystemen stützen die Hypothese, dass oxidierte Phospholipide aus Lipoproteinen eine Rolle bei der Akquirierung von Monozyten in der frühen Atherosklerose spielen.

1.4.1 Rezeptoren für oxidierte Phospholipide

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass Ox-PAPC bzw. spezifische darin enthaltene Phospholipide *in-vitro* eine Reihe von Rezeptoren aktivieren (33–35). Für die vorliegende Arbeit relevant sind insbesondere jene Studien, welche die Chemokin-Induktion durch oxidierte Phospholipide in Zusammenhang mit *Toll-like* Rezeptoren (TLR) bringen (33,34). TLR sind Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*) des angeborenen Immunsystems, welche Pathogen-assoziierte molekulare Muster (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) erkennen (18). TLR2 und TLR4 werden in humanen atherosklerotischen Plaques von Endothelzellen und Makrophagen exprimiert (36). ApoE-TLR4 Doppel-Knockout Mäuse weisen bei gleichermaßen erhöhtem Plasma-Cholesterin eine verminderte aortale Atherosklerose auf (37). Diese Beobachtung legt nahe, dass ein endogener TLR4-Ligand in diesem Modell eine proatherogene Wirkung aufweist (18). In der Bruneck-

Studie wurde bei Teilnehmern mit dem Asp299Gly TLR4-Polymorphismus, welcher den TLR4-Signalweg abschwächt, ein vermindertes Risiko für eine Atherosklerose der Arteria carotis communis gefunden (38). Ox-PAPC und insbesondere das darin enthaltene PEIPC stimulieren humane aortale Endothelzellen zur Produktion von Interleukin-8 (IL-8) (39), einem Chemokin, welches eine Rolle bei der Rekrutierung von Monozyten in atherosklerotische Läsionen spielt (40,41). Dieser Effekt konnte weitestgehend inhibiert werden durch Transfektion mit einem dominant-negativen TLR4-Konstrukt oder mit einem Antisense-Oligonukleotid gegen TLR4 (33), was auf eine essentielle Rolle von TLR4 in der Induktion von IL-8 durch oxidierte Phospholipide hinweist. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Ox-PAPC in Makrophagen von Wildtyp-Mäusen, jedoch nicht in Makrophagen von TLR2-Knockout-Mäusen, die Chemokine *Macrophage inflammatory protein 1α* (MIP-1α) sowie *keratinocyte-derived chemokine* (KC), einem IL-8 Homolog, induziert (34). Dies spricht dafür, dass manche Effekte von oxidierten Phospholipiden über TLR2 vermittelt werden.

1.5 Die Rolle von Chemokinen in der Atherosklerose

Chemokine sind kleine (8-12 kDa) Cytokine mit chemotaktischen Eigenschaften, welche eine Schlüsselrolle bei der Leukozytenrekrutierung in atherosklerotische Läsionen spielen (42). In Abhängigkeit von Anzahl und Position der N-terminalen Cysteinreste unterscheidet man verschiedene Subklassen: C-, CC-, CXC- und CX₃X-Chemokine. Chemokin-Rezeptoren sind in der Regel G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Hierbei kann ein Chemokin mehrere Rezeptor aktivieren bzw. kann umgekehrt ein Chemokin-Rezeptor mehrere Liganden aufweisen (18). Chemokine und deren Rezeptoren werden von allen Zellklassen atherosklerotischer Läsionen exprimiert, d.h. Endothelzellen, glatte Gefäßmuskelzellen und Leukozyten (43).

Die Monozyten-Rekrutierung beginnt mit dem „Rollen“ der Monozyten an aktiviertem Endothel. Dieses wird über endotheliale Selektine (E-Selektin, P-Selektin) vermittelt, welche mit Glycoprotein-Liganden an Monozyten

interagieren (44). Während des „Rollens“ werden die Monozyten durch „Arrest“-Chemokine aktiviert, welche an der luminalen Endotheloberfläche gebunden sind (44). Dies führt zur Aktivierung von Integrinen, wie *Monocyte very late antigen 4* (VLA-4) und *Monocyte lymphocyte function-associated antigen 1* (LFA-1). Diese interagieren mit den endothelialen Zelladhäsionsmolekülen *Vascular adhesion molecule 1* (VCAM-1) und *Intercellular adhesion molecule 1* (ICAM-1), was zur festen Adhärenz der Monozyten am Endothel führt. Im ApoE-Knockout Mausmodell ist die endotheliale Expression von VCAM-1 an Prädilektionsstellen der Atherosklerose gegenüber Wildtypmäusen erhöht. Die Expression von VCAM-1 geht hierbei der Läsionsbildung voraus (45). ICAM-1 wird auch bei Wildtypmäusen an endothelialen Prädilektionsstellen exprimiert (45). Dies spricht für eine endotheliale Aktivierung an Gefäßverzweigungen mit gestörtem laminaren Fluss mit zusätzlichem Einfluss einer Hypercholesterinämie (18). Anschließend an die feste Adhärenz erfolgt die Transmigration der Monozyten in die Intima, ebenfalls unter dem Einfluss von Chemokinen wie MCP-1 (42).

1.6 Ziele der Arbeit

Wie oben dargestellt weisen umfangreiche *in-vitro* Studien auf die pathogenetische Rolle von Ox-PAPC in der frühen Atherosklerose hin. Bislang gab es jedoch kein *in-vivo* Modell, welches erlaubt, direkt die Wirkungen oxidierter Phospholipide auf die Gefäßwand zu untersuchen. Es ist daher nicht bekannt, ob protektive Enzyme wie Paraoxonase oder *Platelet-activating factor* Acetyl-Hydrolase Ox-PAPC *in-vivo* deaktivieren (20,29). Zudem sind Untersuchungen der Leukozyten-Endothelinteraktion in statischen Ko-Kultursystemen dahingegen limitiert, dass sie keine Aussage über die Verhältnisse unter Fluss ermöglichen. Die Ziele der vorliegenden Arbeit waren daher: 1) ein Tiermodell zu entwickeln, um Ox-PAPC direkt an arterielle Gefäße zu applizieren und dessen Wirkungen auf die Expression von Chemokinen und anderen Atherosklerose-

assoziierten Genen zu untersuchen, 2) das induzierte Genexpressions-Muster mit jenem im ApoE-Knockout-Mausmodell zu vergleichen, sowie 3) in einem *ex-vivo* Perfusionsmodell die funktionelle Relevanz von Ox-PAPC-induzierten Chemokinen zu untersuchen.

2 Originalarbeit

Oxidized Phospholipids Trigger Atherogenic Inflammation in Murine Arteries

Alexander Furnkranz, Andreas Schober, Valery N. Bochkov, Pavel Bashtrykov, Gerhard Kronke, Alexandra Kadl, Bernd R. Binder, Christian Weber, Norbert Leitinger

Objective—Lipoprotein-derived phospholipid oxidation products have been implicated as candidate triggers of the inflammatory process in atherosclerosis. However, in vivo evidence regarding the impact of oxidized phospholipids on the artery wall thus far has been elusive. Therefore, the aim of this study was to investigate if structurally defined oxidized phospholipids induce expression of atherogenic chemokines and monocyte adhesion in intact murine arteries.

Methods and Results—To model the accumulation of oxidized phospholipids in the arterial wall, oxidized 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-*sn*-3-glycero-phosphorylcholine (OxPAPC) was topically applied to carotid arteries in mice using pluronic gel. Using quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (PCR) and immunohistochemistry, we show that OxPAPC induced a set of atherosclerosis-related genes, including monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) and keratinocyte-derived chemokine (KC), tissue factor (TF), interleukin 6 (IL-6), heme oxygenase 1 (HO-1), and early growth response 1 (EGR-1). OxPAPC-regulated chemokines were also expressed in atherosclerotic lesions of apolipoprotein E-deficient (ApoE^{-/-}) mice. In isolated perfused carotid arteries, OxPAPC triggered rolling and firm adhesion of monocytes in a P-selectin and KC-dependent manner.

Conclusion—Oxidized phospholipids contribute to vascular inflammation in murine arteries in vivo, initiating atherogenic chemokine expression that leads to monocyte adhesion; therefore, they can be regarded as triggers of the inflammatory process in atherosclerosis. (*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:633-638.)

Key Words: atherosclerosis ■ oxidized phospholipids ■ inflammation ■ chemokines ■ leukocyte adhesion

Atherosclerosis is a chronic inflammatory disease involving accumulation of lipoproteins and mononuclear cells in the subendothelial space. Chemokines serve a vital role in supporting the inflammatory response of the arterial wall, leading to atherosclerotic plaque formation. In particular, genetic deletions of monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) or its receptor CCR2, as well as transplantation of bone marrow deficient in the IL-8 receptor homologue CXCR2,¹⁻³ have been shown to decrease monocyte accumulation and lesion formation in mice susceptible to atherosclerosis. Although our knowledge about the mechanisms underlying atherosclerosis and its complications has dramatically increased, the question about the initiating factors or triggers of atherogenesis remains unsolved. Accumulating evidence suggests retention of low-density lipoprotein (LDL) particles in the subendothelial space with subsequent oxidative modification as key steps in beginning atherosclerosis. Oxidized LDL has been shown to induce chemokines such as MCP-1 in vascular cells, but direct evidence from suitable animal models is scarce and it has been questioned if lipoproteins

oxidized in vitro yield similar biological responses as lipoproteins oxidized in the arterial wall.⁴ Recently, considerable advances have been made in dissecting the molecular components of oxidized LDL responsible for its pro-atherogenic effect, allowing for the experimental use of defined compounds rather than complex lipoproteins. Initially, LDL oxidation gives rise to minimally oxidized LDL,⁵ the biological activity of which results primarily from oxidation of phospholipids, such as 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-*sn*-3-glycero-phosphorylcholine (PAPC), yielding a series of oxidation products (OxPAPC), some of which have been structurally identified and shown to accumulate in atherosclerotic lesions.^{6,7} The atherogenic potential of OxPAPC has been demonstrated in cell culture studies as shown by enhanced monocyte, but not neutrophil, binding to OxPAPC-stimulated endothelial cells, as well as induction of MCP-1 and IL-8.^{8,9} However, static coculture systems only incompletely model the complex cellular interactions in the vessel wall and provide no information as to whether monocyte-endothelial interactions occur under flow. Moreover, in vivo, inactivation

Original received July 23, 2004; final version accepted November 23, 2004.

From the Department of Vascular Biology and Thrombosis Research (A.F., V.N.B., G.K., A.K., B.R.B., N.L.), University of Vienna, Austria; Wilhelminen Hospital (A.F.), Vienna, Austria; the Department of Cardiovascular Molecular Biology (A.S., C.W.), University of Aachen, Germany; and the Cardiology Research Center (P.B.), Moscow, Russia.

Current affiliation for G.K., A.K., and N.L.: Cardiovascular Research Center, University of Virginia, Charlottesville.

Correspondence to Norbert Leitinger, Cardiovascular Research Center, University of Virginia, PO Box 801394, Charlottesville, VA 22908. E-mail nl2q@virginia.edu

© 2005 American Heart Association, Inc.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. is available at <http://www.atvbaha.org>

DOI: 10.1161/01.ATV.0000153106.03644.a0

of oxidized phospholipids by protective enzymes such as paraoxonase or platelet-activating factor acetyl-hydrolase may occur, limiting the proinflammatory potential of these lipids. Therefore, the purpose of this study was to investigate if OxPAPC induces atherogenic chemokines or other inflammatory genes in the arterial wall in vivo and whether this would entail monocyte adhesion to the arterial endothelium.

Methods

Animals

C57BL/6J mice were purchased from the Institut fuer Versuchstierzucht und haltung (Himberg, Austria). *ApoE*^{-/-} mice on a C57BL/6J genetic background were acquired from the Proefdierencentrum (Leuven, Belgium). Mice were kept on a 12-hour dark/light cycle and received water and regular chow ad libitum.

Application of OxPAPC to Carotid Arteries

OxPAPC was obtained by air oxidation of dry PAPC (Sigma-Aldrich) as described previously.⁶ Immediately before surgical application, dry OxPAPC or PAPC was dissolved in cold 1% (wt/vol) F-127 pluronic gel (Sigma-Aldrich) in sterile water, followed by addition of 5 volumes of 50% (wt/vol) F-127. Sixty μ L of F-127 with or without 50 μ g OxPAPC, 50 μ g PAPC, or 6 μ g lipopolysaccharide (LPS) (*Escherichia coli* serotype 055:B5; Sigma-Aldrich) was applied to carotid vessels. At indicated time points, animals were euthanized, perfused for 5 minutes with PBS via the left ventricle, and the treated part of the common carotid artery was removed. For comparison of gene expression levels between *ApoE*^{-/-} and wild-type animals, mice were used at 12 months of age, at which time common carotid arteries of *ApoE*^{-/-} mice showed typical macrophage-rich lesions at the proximal and distal bifurcation.¹⁰ Relative quantification of gene expression was performed as described.¹¹ Details about surgical procedures, tissue harvesting, RNA isolation, quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR), used PCR primers (Table 1), and immunohistochemistry are given in the online supplement (please see <http://atvb.ahajournals.org>).

Ex Vivo Perfusion Model

Cell rolling and arrest of calcein-labeled monocytic MM6 cells (1×10^6 /mL) on endothelium of common carotid arteries from 10- to 12-week-old C57BL/6J mice were determined by epifluorescence videomicroscopy as described,¹² after preperfusion with OxPAPC or native PAPC (100 μ g/mL, in sterile filtered MOPS-buffered physiological salt solution with 0.5% human serum albumin), for 4 hours at 37°C. Some carotid arteries were perfused with blocking antibody to KC (20 μ g/mL, clone 124014; R&D Systems, Minneapolis, Minn) or P-selectin (30 μ g/mL, RB40.34; Pharmingen, San Diego, Calif) for 20 minutes after OxPAPC treatment. Rolling flux was determined by counting the number of cells that rolled on the vessel wall for at least 1 second during an 8-minute period.

Statistical Analysis

Data are expressed as mean $\pm$ SEM. Results were analyzed using unpaired Student *t* test (gene expression data) or 1-way ANOVA with Newman-Keuls post-test (ex vivo perfusion model). Differences were considered statistically significant at a value of $P < 0.05$.

Results

Induction of Chemokine Expression by OxPAPC In Vivo

To investigate effects of oxidized phospholipids on the arterial wall in vivo, we applied F-127 pluronic gel with or without 50 μ g OxPAPC to surgically exposed carotid arteries of C57BL/6 mice. This corresponds to a concentration of the bioactive phospholipids 1-palmitoyl-2-(5-oxovaleroyl)-*sn*-

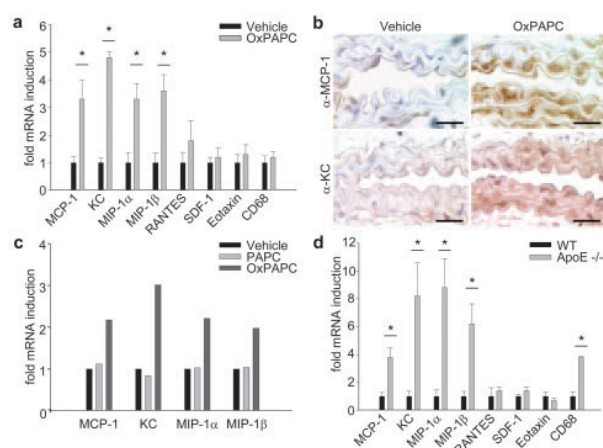


Figure 1. Chemokine induction by OxPAPC. a, OxPAPC induces MCP-1, KC, MIP-1 α , and MIP-1 β mRNA after 6 hours in murine carotid arteries, $*P < 0.05$ ($n = 4$). b, Vehicle- or OxPAPC-treated (24 hours) carotid arteries stained with antibody against MCP-1 (upper panel) or with antibody against KC (lower panel). Scale bar represents 20 μ m. c, Native PAPC does not influence arterial gene expression after 6 hours. One experiment is shown representing pooled arteries from 3 animals. d, Chemokine mRNA expression in atherosclerotic carotids of *ApoE*^{-/-} mice versus wild-type (WT) control animals. $*P < 0.05$ ($n = 4$).

glycero-3-phosphorylcholine and 1-palmitoyl-2-glutaryl-*sn*-glycero-3-phosphorylcholine of ≈ 30 μ g/mL in the gel,⁹ which is lower than the concentrations measured in rabbit atherosclerotic lesions.¹³ F-127 dissolves within several hours and releases trapped lipids, allowing for topical exposure of arteries while minimizing systemic effects.¹⁴ We used this system to investigate differential expression between OxPAPC, native PAPC and mock-treated arteries of a set of atherosclerosis-related chemokines, including MCP-1 and KC (keratinocyte-derived chemokine, CXCL1), the murine chemokine closest related to human IL-8. Quantitative RT-PCR showed that treatment of carotid arteries for 6 hours with 50 μ g OxPAPC in vivo increased vascular expression of MCP-1 (3.3 ± 0.68 -fold) and KC (4.8 ± 0.22 -fold), as compared with mock-treated arteries (Figure 1a). Immunohistochemistry of carotid arteries treated for 24 hours with OxPAPC confirmed these findings (Figure 1b), showing homogenous chemokine distribution throughout the vessel wall, a pattern also reported in atherosclerotic carotid arteries of *ApoE*^{-/-} mice.¹² In addition, treatment of carotid arteries with OxPAPC induced MIP-1 α (3.3 ± 0.57 -fold) and MIP-1 β (3.6 ± 0.59 -fold), whereas RANTES, serum-derived factor-1, and eotaxin were not induced (Figure 1a). To confirm previous in vitro observations that nonoxidized PAPC is not biologically active,^{6,13} we included a PAPC group in 1 experiment representing 3 animals. Application of 50 μ g nonoxidized PAPC to carotid arteries did not influence gene expression levels as compared with mock-treated arteries (Figure 1c), demonstrating that oxidative modification of phospholipids was necessary to form pro-inflammatory agonists. Investigation of untreated contralateral carotid arteries, as well as other organs, revealed that systemic effects of OxPAPC were negligible (data not shown).

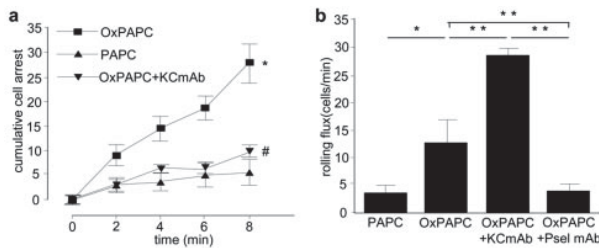


Figure 2. OxPAPC induces rolling and firm arrest of MM6 cells in isolated perfused carotid arteries. **a**, Preperfusion with OxPAPC, but not native PAPC, leads to firm arrest of MM6 cells in murine carotid arteries. Perfusion with a blocking antibody to KC (KC mAb) after treatment with OxPAPC reduces MM6 cell arrest to control (PAPC) levels. * $P < 0.01$ versus PAPC, # $P < 0.05$ versus OxPAPC ($n = 4$ to 5). **b**, Preperfusion with OxPAPC leads to rolling of MM6 cells on endothelium of murine carotid arteries. Perfusion with a blocking antibody to KC (KCmAb, bar 3) after treatment with OxPAPC enhances rolling flux, whereas perfusion with a blocking antibody to P-selectin (Psel mAb, bar 4) reduces cell rolling to control (PAPC) levels. * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$ ($n = 3$ to 6).

Chemokine Expression in Murine Atherosclerosis

The chemokines tested in this study have been found in atherosclerotic lesions of varying species and different locations of the arterial tree. To investigate if OxPAPC-induced chemokines were also expressed in atherosclerotic arteries, we determined chemokine expression levels in carotid arteries of *ApoE*^{-/-} mice as compared with normal carotids from age-matched wild-type mice by quantitative RT-PCR. MCP-1, KC, MIP-1 α , and MIP-1 β showed enhanced expression in arteries of *ApoE*^{-/-} mice, whereas expressions of RANTES, serum-derived factor-1, and eotaxin were not increased (Figure 1d). Enhanced expression of CD68 indicated the presence of macrophages in lesions of *ApoE*^{-/-} mice (Figure 1d); however, we did not find increased CD68 in OxPAPC-treated arteries (Figure 1a), suggesting that chemokine production in OxPAPC-treated arteries was mainly by resident cells of the arterial wall.

OxPAPC Triggers Monocyte Rolling and Arrest in Native Murine Arteries

Chemokines support inflammation in atherogenesis by rapidly activating mononuclear leukocytes, leading to integrin-dependent cell arrest on inflamed endothelium, a prerequisite for transmigration.¹⁵ To investigate if oxidized phospholipids can trigger firm adhesion of circulating monocytes on arterial endothelium, we used isolated carotid arteries from C57BL/6 mice that had been perfused ex vivo for 4 hours with OxPAPC or native PAPC as control. Arteries were subsequently perfused with calcein-labeled monocytic Mono-Mac-6 (MM6) cells, and MM6 cell arrest was determined as described in Methods. We found that firm adhesion of MM6 cells was dramatically increased in OxPAPC-treated carotid arteries at the region of the bifurcation, whereas minimal adhesive interactions were observed in arteries treated with native PAPC (Figure 2a). Cell arrest was preceded by a short period of rolling in OxPAPC-treated arteries, which was negligible in control arteries treated with unoxidized PAPC (Figure 2b).

OxPAPC-Induced Monocyte Rolling and Arrest Are Mediated by P-Selectin and KC, Respectively

Among the chemokines found to be upregulated by OxPAPC in the artery wall, KC has been shown to play a dominant role in triggering monocyte arrest on early atherosclerotic endothelium in ex vivo perfused carotid arteries of *ApoE*^{-/-} mice.¹² We hypothesized that KC serves a similar function in OxPAPC-stimulated arteries. Preperfusion of a blocking KC antibody in OxPAPC-treated carotid arteries reduced MM6 cell arrest to levels seen in control arteries (Figure 2a), indicating that OxPAPC-induced monocyte arrest was critically dependent on KC.

Next, we were interested if OxPAPC-induced monocyte rolling would also involve mechanisms analogous to those in murine atherosclerosis. The selectin family of adhesion molecules mediates initial attachment and rolling of leukocytes on vascular endothelium,¹⁵ and functional blocking of P-selectin has been shown to abrogate monocyte rolling on atherosclerotic endothelium in isolated murine carotid arteries.¹⁶ Here, we found that preperfusion with a blocking P-selectin antibody abolished MM6 cell rolling in OxPAPC-treated arteries (Figure 2b), demonstrating a crucial role for P-selectin in OxPAPC-triggered monocyte rolling. However, preperfusion with a blocking KC antibody enhanced rolling flux (Figure 2b). In accord with this observation, continuous P-selectin-dependent monocyte rolling without arrest has been observed in atherosclerotic carotid arteries when blocking $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4), the integrin on monocytes that mediates KC-triggered cell arrest.^{12,17}

OxPAPC Induces Expression of Other Atherosclerosis-Related Genes In Vivo

In addition to chemokines, OxPAPC induces several other atherosclerosis-related genes in cells of the artery wall in vitro. Recently, we showed induction of tissue factor (TF) by OxPAPC in human endothelial cells, accompanied by and dependent on the expression of early growth response-1 (EGR-1).¹⁸ Both genes have been implicated in human and experimental murine atherosclerosis.^{19,20} To investigate if these effects would also be observed in the arterial wall in vivo, TF and EGR-1 mRNA levels were determined by quantitative RT-PCR in murine carotid arteries treated for 6 hours with OxPAPC or vehicle alone. OxPAPC treatment led to upregulation of both TF (2.6 ± 0.62 -fold) and EGR-1 (2.0 ± 0.35 -fold) transcripts in carotid arteries (Figure 3).

IL-6 has been shown to be expressed in atherosclerotic lesions in mice.²¹ Furthermore, IL-6 has been reported to mediate effects of OxPAPC such as decreased hepatic para-oxonase expression in mice.²² Here, OxPAPC treatment induced IL-6 mRNA 3.5 ± 0.6 -fold compared with vehicle-treated arteries (Figure 3). In addition, OxPAPC has been shown to induce the protective gene heme oxygenase-1 (HO-1) in vascular cells in vitro.^{23,24} Here, treatment of carotid arteries with OxPAPC induced HO-1 message 3.6 ± 0.34 -fold (Figure 3).

OxPAPC-Induced Inflammation Versus LPS-Induced Inflammation

Target gene expression induced by OxPAPC differs from that induced by other inflammatory mediators such as LPS or

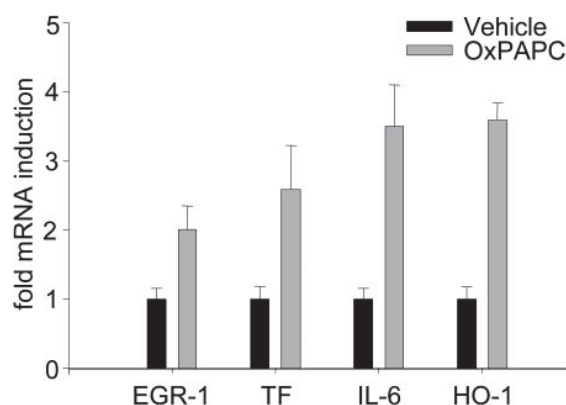


Figure 3. OxPAPC induces atherosclerosis-related genes in murine carotid arteries after 6 hours. $P < 0.05$ ($n = 4$) for all comparisons between vehicle and OxPAPC group.

tumor necrosis factor- α .^{25–27} We have shown previously that expression of the adhesion molecules E-selectin, vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), or intercellular adhesion molecule-1 is not induced by OxPAPC in vitro.⁹ Consistently, quantitative RT-PCR, as well as immunohistochemistry, showed that treatment of carotid arteries with LPS effectively upregulated expression of E-selectin, VCAM-1, or intercellular adhesion molecule-1, whereas treatment with OxPAPC had no effect (Figure 4a and 4b). In contrast to LPS, OxPAPC did not upregulate P-selectin mRNA in murine arteries (Figure 4a), suggesting that monocyte rolling after OxPAPC treatment (Figure 2b) was mediated by surface translocation of P-selectin from Weibel–Palade bodies.²⁸

Discussion

A growing body of evidence suggests oxidized phospholipids as triggers of vascular inflammation in early atherosclerosis. Most importantly, component lipids of OxPAPC have been detected in atherosclerotic lesions in concentrations sufficient to stimulate vascular cells.^{6,13} However, evidence for a direct contribution of oxidized phospholipids to vascular inflammation in vivo has not yet been obtained. Thus, to model the accumulation of oxidized phospholipids in the arterial wall during atherogenesis, we applied OxPAPC to the adventitia of carotid arteries of C57BL/6 mice using a slow-release preparation. The murine carotid artery consists of only 4 to 5 cell layers, facilitating penetration of the lipids through the vessel wall. The high sensitivity offered by real-time PCR

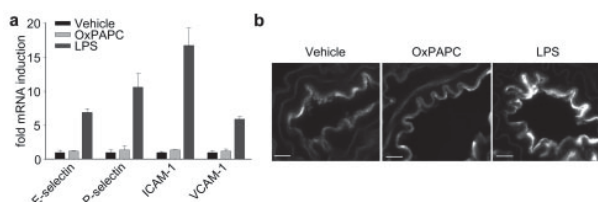


Figure 4. a, LPS, but not OxPAPC, induces vascular expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), and VCAM-1 mRNA after 6 hours. $P < 0.05$ ($n = 3$) for all comparisons between vehicle and LPS group. b, Vehicle, OxPAPC, or LPS-treated (24 hours) carotid arteries stained with antibody against VCAM-1. Scale bar represents 20 μm .

allows quantifying gene expression from such minute samples. In this model, OxPAPC induced several chemokines in the carotid artery wall that are also expressed in human or experimental atherosclerosis.²⁹ Accordingly, investigation of atherosclerotic carotid arteries from *ApoE*^{−/−} mice revealed that OxPAPC-induced chemokines are expressed in atherosclerotic lesions in mice. Interestingly, the chemokines RANTES, eotaxin, and serum-derived factor-1 were not regulated by OxPAPC in murine arteries, nor were they differentially expressed in atherosclerotic versus normal arteries in *ApoE*^{−/−} mice. However, a nontranscriptional mechanism of RANTES deposition by activated platelets has been described.³⁰

Importantly, tissue composition differs between native arteries and established atherosclerotic lesions as indicated by high expression of the macrophage marker CD68 in arteries of *ApoE*^{−/−} mice. Thus, although not being representative of the complex cellular interactions in atherosclerotic lesions, our data indicate that OxPAPC accumulation triggers atherogenic chemokine expression and monocyte adhesion in the normal artery wall, underscoring the role of oxidized phospholipids in early lesion formation.⁵ Besides MCP-1 and KC, whose role in atherogenesis is firmly established, we found MIP-1 α and β to be expressed in OxPAPC-stimulated, as well as in atherosclerotic, arteries. MIP-1 α and β are members of the CC chemokine subfamily that attract monocytes and lymphocytes.²⁹ In addition, MIP-1 β induces TF activity in vascular smooth muscle cells.³¹

To investigate whether OxPAPC-induced chemokine expression resulted in arterial monocyte adhesion, a hallmark of early atherogenesis, we used ex vivo perfused carotid arteries, a model that has been used extensively to study monocyte–endothelial interactions in atherosclerosis.^{12,16,17} In our study, OxPAPC stimulation led to monocyte rolling and firm adhesion in normal murine arteries. Firm adhesion of monocytes is mediated by arrest chemokines immobilized on the endothelial surface, leading to integrin activation or clustering on rolling leukocytes.¹⁵ It is not known which chemokines serve this function in OxPAPC-stimulated arteries; however, it has been shown that KC, but not MCP-1, triggers monocyte arrest on early atherosclerotic endothelium in isolated carotid arteries of *ApoE*^{−/−} mice.¹² Thus, we functionally blocked KC in OxPAPC-stimulated arteries, and the results demonstrated that OxPAPC-induced monocyte arrest was completely dependent on KC.

In addition, it has been shown that functional blocking of P-selectin abrogates monocyte rolling on atherosclerotic endothelium in mice in vivo,³² as well as in isolated carotid arteries.¹⁶ Here, we found that OxPAPC-induced monocyte rolling was also dependent on P-selectin in isolated carotid arteries. Although we did not find induction of P-selectin mRNA in OxPAPC-treated carotid arteries in vivo, oxidized LDL has been shown to induce surface translocation of preformed P-selectin from Weibel–Palade bodies.²⁸

Together, our data support a mechanism of OxPAPC-induced monocyte adhesion in which P-selectin mediates initial attachment and rolling on arterial endothelium, with subsequent activation and arrest triggered by immobilized KC. Although playing an important and nonredundant independent role in atherogenesis, MCP-1 is not involved in

initial monocyte arrest on early atherosclerotic endothelium in murine carotid arteries.¹² Similarly, OxPAPC-induced MCP-1 could be rather involved in subsequent transmigration of adherent monocytes. Thus, our data are in accordance with observations on atherosclerotic vessels in mice and strongly suggestive of a role for oxidized phospholipids as triggers of monocyte recruitment to atherosclerotic lesions.

In ApoE^{-/-} mice, KC has been shown to act via VLA-4 on monocytes, which binds to VCAM-1 and fibronectin containing the CS-1 region.^{12,17} We did not observe induction of VCAM-1 by OxPAPC; however, at sites of atherosclerosis predilection, such as the lesser curvature of the aortic arch, VCAM-1 is expressed in C57Bl/6J mice, possibly because of hemodynamic influences.³³ However, binding of monocytes to OxPAPC-stimulated endothelial cells is mediated by CS-1 fibronectin³⁴ and blocking CS-1 reduced atherosclerotic lesion formation in mice.³⁵

In addition to expression of chemokines, we found that OxPAPC induced expression of several other atherosclerosis-related genes. We demonstrate that oxidized phospholipids induce IL-6 transcripts in a native murine artery in vivo. Circulating levels of IL-6 predict future myocardial infarction in apparently healthy men.³⁶ Because IL-6 was shown to be expressed in atherosclerotic lesions in humans³⁷ and ApoE^{-/-} mice,²¹ atherosclerotic sites themselves likely contribute to elevated circulating IL-6 levels. Thus, our data suggest oxidized phospholipids contributing to IL-6 production in atherosclerosis. Moreover, we demonstrate induction of TF by OxPAPC. Enhanced TF expression has been demonstrated in atherosclerotic plaques,¹⁹ a process that may account for thrombotic events associated with early and advanced atherosclerosis. A transcription factor capable of binding to the TF promoter is EGR-1, which is critically involved in TF gene regulation.¹⁸ We have previously shown that OxPAPC increases EGR-1 as well as TF expression in cultured endothelial cells, and that TF induction by OxPAPC is dependent on EGR-1.¹⁸ Our data suggest that oxidized phospholipids contribute to EGR-1 expression in atherosclerosis, thereby enhancing expression of TF and possibly other EGR-1-inducible genes.²⁰ Finally, we found induction of HO-1 by OxPAPC in murine arteries. HO-1 is expressed in experimental as well as human atherosclerotic lesions,³⁸ where it is thought to counteract continuous oxidative stress by its antioxidant and anti-inflammatory properties. Thus, induction of HO-1 by oxidized phospholipids in the artery wall may constitute an adaptive response to limit the inflammatory reaction. It was demonstrated that formation of atherosclerotic lesions in ApoE^{-/-} mice was accompanied by decreased expression of various antioxidant enzymes, whereas HO-1 mRNA levels remained high during the course of atherogenesis,³⁹ indicating continuous stimulation likely to be caused by oxidized phospholipids.

Finally, we show that OxPAPC-induced expression of inflammatory genes in carotid arteries differs from that induced by LPS. Although LPS-induced or tumor necrosis factor-induced inflammation would result in adhesion and accumulation of neutrophils and monocytes, the gene expression pattern elicited by "lipid-induced inflammation" may determine monocyte specificity.

In conclusion, we have shown that oxidized phospholipids, known to accumulate in atherosclerotic lesions, induce expression of atherogenic chemokines and other inflammation-related genes in the arterial wall in vivo. Furthermore, we demonstrate a major role for KC in mediating oxidized phospholipid-induced monocyte adhesion to murine arteries. Thus, oxidized phospholipids can be considered as triggers of the inflammatory process in the vascular wall and therefore represent promising molecular targets to combat atherogenesis and its clinical consequences.

Acknowledgments

This work supported by grants from the Austrian Science Fund (to F.W.F.); the Austrian National Bank; the Center for Molecular Medicine (CEMM); and the European Vascular Genomics Network (<http://www.evgn.org>), a Network of Excellence supported by the European Community's sixth Framework Programme for Research Priority 1 "Life sciences, genomics and biotechnology for health" (Contact No. LSHM-CT-2003-503254).

References

- Gu L, Okada Y, Clinton SK, Gerard C, Sukhova GK, Libby P, Rollins BJ. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell*. 1998;2: 275–281.
- Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF. Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature*. 1998;394:894–897.
- Boisvert WA, Santiago R, Curtiss LK, Terkeltaub RA. A leukocyte homologue of the IL-8 receptor CXCR-2 mediates the accumulation of macrophages in atherosclerotic lesions of LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest*. 1998;101:353–363.
- Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and Atherosclerosis. *Circulation*. 2002;105:1135–1143.
- Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000;407:233–241.
- Watson AD, Leitinger N, Navab M, Faull KF, Horkko S, Witztum JL, Palinski W, Schwenke D, Salomon RG, Sha W, Subbanagounder G, Fogelman AM, Berliner JA. Structural identification by mass spectrometry of oxidized phospholipids in minimally oxidized low density lipoprotein that induce monocyte/endothelial interactions and evidence for their presence in vivo. *J Biol Chem*. 1997;272:13597–13607.
- Watson AD, Subbanagounder G, Welsbie DS, Faull KF, Navab M, Jung ME, Fogelman AM, Berliner JA. Structural identification of a novel pro-inflammatory epoxyisoprostane phospholipid in mildly oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem*. 1999;274:24787–24798.
- Lee H, Shi W, Tontonoz P, Wang S, Subbanagounder G, Hedrick CC, Hama S, Borromeo C, Evans RM, Berliner JA, Nagy L. Role for peroxisome proliferator-activated receptor alpha in oxidized phospholipid-induced synthesis of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 by endothelial cells. *Circ Res*. 2000;87:516–521.
- Leitinger N, Tyner TR, Oslund L, Rizza C, Subbanagounder G, Lee H, Shih PT, Mackman N, Tigyi G, Territo MC, Berliner JA, Vora DK. Structurally similar oxidized phospholipids differentially regulate endothelial binding of monocytes and neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:12010–12015.
- Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross R. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb*. 1994;14:133–140.
- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001;29:E45.
- Huo Y, Weber C, Forlow SB, Sperandio M, Thatté J, Mack M, Jung S, Littman DR, Ley K. The chemokine KC, but not monocyte chemoattractant protein-1, triggers monocyte arrest on early atherosclerotic endothelium. *J Clin Invest*. 2001;108:1307–1314.
- Subbanagounder G, Leitinger N, Schwenke DC, Wong JW, Lee H, Rizza C, Watson AD, Faull KF, Fogelman AM, Berliner JA. Determinants of bioactivity of oxidized phospholipids. Specific oxidized fatty acyl groups at the sn-2 position. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:2248–2254.
- Hu Y, Zou Y, Dietrich H, Wick G, Xu Q. Inhibition of Neointima Hyperplasia of Mouse Vein Grafts by Locally Applied Suramin. *Circulation*. 1999;100:861–868.

15. Weber C. Novel mechanistic concepts for the control of leukocyte transmigration: specialization of integrins, chemokines, and junctional molecules. *J Mol Med.* 2003;81:4–19.
16. Ramos CL, Huo Y, Jung U, Ghosh S, Manka DR, Sarembock IJ, Ley K. Direct demonstration of P-selectin- and VCAM-1-dependent mononuclear cell rolling in early atherosclerotic lesions of apolipoprotein E-deficient mice. *Circ Res.* 1999;84:1237–1244.
17. Huo Y, Hafezi-Moghadam A, Ley K. Role of vascular cell adhesion molecule-1 and fibronectin connecting segment-1 in monocyte rolling and adhesion on early atherosclerotic lesions. *Circ Res.* 2000;87:153–159.
18. Bochkov VN, Mechtcheriakova D, Lucerna M, Huber J, Malli R, Graier WF, Hofer E, Binder BR, Leitinger N. Oxidized phospholipids stimulate tissue factor expression in human endothelial cells via activation of ERK/EGR-1 and Ca(++)/NFAT. *Blood.* 2002;99:199–206.
19. Moons AHM, Levi M, Peters RJG. Tissue factor and coronary artery disease. *Cardiovasc Res.* 2002;53:313–325.
20. McCaffrey TA, Fu C, Du B, Eksinar S, Kent KC, Bush H Jr, Kreiger K, Rosengart T, Cybulsky MI, Silverman ES, Collins T. High-level expression of Egr-1 and Egr-1-inducible genes in mouse and human atherosclerosis. *J Clin Invest.* 2000;105:653–662.
21. Sukovich DA, Kauser K, Shirley FD, DeVecchio V, Halks-Miller M, Rubanyi GM. Expression of interleukin-6 in atherosclerotic lesions of male ApoE-knockout mice: inhibition by 17beta-estradiol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18:1498–1505.
22. Van Lenten BJ, Wagner AC, Navab M, Fogelman AM. Oxidized phospholipids induce changes in hepatic paraoxonase and ApoJ but not monocyte chemoattractant protein-1 via interleukin-6. *J Biol Chem.* 2001;276:1923–1929.
23. Ishikawa K, Navab M, Leitinger N, Fogelman AM, Lusis AJ. Induction of heme oxygenase-1 inhibits the monocyte transmigration induced by mildly oxidized LDL. *J Clin Invest.* 1997;100:1209–1216.
24. Kronke G, Bochkov VN, Huber J, Gruber F, Bluml S, Furnkranz A, Kadl A, Binder BR, Leitinger N. Oxidized phospholipids induce expression of human heme oxygenase-1 involving activation of cAMP-responsive element-binding protein. *J Biol Chem.* 2003;278:51006–51014.
25. Kadl A, Huber J, Gruber F, Bochkov VN, Binder BR, Leitinger N. Analysis of inflammatory gene induction by oxidized phospholipids in vivo by quantitative real-time RT-PCR in comparison with effects of LPS. *Vascul Pharmacol.* 2002;38:219–227.
26. Yeh M, Leitinger N, de Martin R, Onai N, Matsushima K, Vora DK, Berliner JA, Reddy ST. Increased transcription of IL-8 in endothelial cells is differentially regulated by TNF-alpha and oxidized phospholipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:1585–1591.
27. Leitinger N. Oxidized phospholipids as modulators of inflammation in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 2003;14:421–430.
28. Vora DK, Fang ZT, Liva SM, Tyner TR, Parhami F, Watson AD, Drake TA, Territo MC, Berliner JA. Induction of P-selectin by oxidized lipoproteins. Separate effects on synthesis and surface expression. *Circ Res.* 1997;80:810–818.
29. Reape TJ, Groot PHE. Chemokines and atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 1999;147:213–225.
30. Huo Y, Schober A, Forlow SB, Smith DF, Hyman MC, Jung S, Littman DR, Weber C, Ley K. Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E. *Nat Med.* 2003;9:61–67.
31. Schecter AD, Calderon TM, Berman AB, McManus CM, Fallon JT, Rossikhina M, Zhao W, Christ G, Berman JW, Taubman MB. Human vascular smooth muscle cells possess functional CCR5. *J Biol Chem.* 2000;275:5466–5471.
32. Eriksson EE, Xie X, Werr J, Thoren P, Lindbom L. Direct viewing of atherosclerosis in vivo: plaque invasion by leukocytes is initiated by the endothelial selectins. *FASEB J.* 2001;15:1149–1157.
33. Iiyama K, Hajra L, Iiyama M, Li H, DiChiara M, Medoff BD, Cybulsky MI. Patterns of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression in rabbit and mouse atherosclerotic lesions and at sites predisposed to lesion formation. *Circ Res.* 1999;85:199–207.
34. Shih PT, Elices MJ, Fang ZT, Ugarova TP, Strahl D, Territo MC, Frank JS, Kovach NL, Cabanas C, Berliner JA, Vora DK. Minimally modified low-density lipoprotein induces monocyte adhesion to endothelial connecting segment-1 by activating beta1 integrin. *J Clin Invest.* 1999;103:613–625.
35. Shih PT, Brennan ML, Vora DK, Territo MC, Strahl D, Elices MJ, Lusis AJ, Berliner JA. Blocking very late antigen-4 integrin decreases leukocyte entry and fatty streak formation in mice fed an atherogenic diet. *Circ Res.* 1999;84:345–351.
36. Ridker PM, Rifai N, Stampfer MJ, Hennekens CH. Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation.* 2000;101:1767–1772.
37. Schieffer B, Schieffer E, Hilfiker-Kleiner D, Hilfiker A, Kovanen PT, Kaartinen M, Nussberger J, Harringer W, Drexler H. Expression of angiotensin II and interleukin 6 in human coronary atherosclerotic plaques: potential implications for inflammation and plaque instability. *Circulation.* 2000;101:1372–1378.
38. Wang LJ, Lee TS, Lee FY, Pai RC, Chau LY. Expression of heme oxygenase-1 in atherosclerotic lesions. *Am J Pathol.* 1998;152:711–720.
39. 't Hoen PAC, Van der Lans CAC, Van Eck M, Bijsterbosch MK, Van Berkel TJC, Twisk J. Aorta of ApoE-deficient mice responds to atherogenic stimuli by a prelesional increase and subsequent decrease in the expression of antioxidant enzymes. *Circ Res.* 2003;93:262–269.

2.1 Originalarbeit - Supplement

Surgical procedure and tissue harvesting

All procedures were approved by the Animal Care and Use Committee of the Vienna University. C57BL/6J mice were used at 12-15 weeks. Mice were anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine (60 mg/kg) and xylazine (4 mg/kg). Using sterile techniques, a left anterior neck incision was set and the left common carotid artery was freed from surrounding tissue. Subsequently, 60 μ l of F-127 with or without 50 μ g OxPAPC, 50 μ g PAPC or 6 μ g lipopolysaccharide (*E. coli* serotype 055:B5, Sigma-Aldrich) was applied to the vessel. Upon gelling of the solution, the skin wound was closed by interrupted sutures. At indicated time points animals were sacrificed, perfused for 5 minutes with PBS via the left ventricle, and the treated part of the common carotid artery was removed. For comparison of gene expression levels between *ApoE*^{-/-} and wildtype animals, mice were used at 12 months of age, at which time common carotid arteries of *ApoE*^{-/-} mice showed typical macrophage-rich lesions at the proximal and distal bifurcation. Common carotid arteries were harvested as described for lipid-treated animals.

RNA isolation and quantitative RT-PCR

Freshly harvested arterial tissue was immediately immersed into ice-cold RNAlater (Ambion, Austin, Texas) and stored at -70°C upon analysis. For each determination, 3 arteries were pooled and 100 ng of total RNA isolated with TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, California) was reverse transcribed to cDNA using GeneAmp RNA PCR core kit (Applied Biosystems, Foster City, California). mRNA sequences of the investigated genes were obtained from GenBank. PCR Primers were designed using PRIMER3

software from the Whitehead Institute for Biomedical Research (Cambridge, Massachusetts) (Table I). Amplified cDNA regions were chosen to span one or more large introns in the genomic sequence to avoid coamplification of genomic DNA. Melting point analysis, agarose gel electrophoresis and DNA sequencing of the PCR product confirmed primer specificity. Quantitative real-time PCR was performed by LightCycler technology using FastStart SYBR Green I (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) as recommended by the manufacturer. The housekeeping gene porphobilinogen deaminase (PBGD) was used as endogenous control. PCR efficiency was determined for each primer pair from dilution series of a typical sample cDNA.

Immunohistochemistry

Immunostaining for MCP-1 and KC was performed on 5 μ m cryosections of acetone-fixed carotid arteries. Slides were incubated with 10% normal rabbit serum for 20 minutes, followed by 15 minutes of avidin and biotin blocking reagent, respectively (Vector Laboratories, Burlingame, California). Polyclonal goat anti-mouse MCP-1 or KC primary antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California) were used at 2 μ g/ml in the presence of 10% normal rabbit serum for 16 hours at 4°C. Slides were developed with Vectastain Elite ABC kit and 3,3'-diaminobenzidine (Vector Laboratories), and counterstained with hematoxylin. Detection of VCAM-1 was performed by incubating 5 μ m cryosections of carotid arteries with 5 μ g/ml monoclonal anti-mouse VCAM-1 primary antibodies (clone M/K2, Southern Biotechnology Associates, Birmingham, Alabama) for 16 hours at 4°C, followed by AlexaFluor-488-

labeled secondary antibodies (Molecular Probes, Eugene, Oregon). Secondary antibodies were visualized by epifluorescence microscopy (Olympus).

Table I. Real-time PCR primers

Gene	GenBank accession	Forward primer	Reverse primer
MCP-1	NM_011333	5'-CTTCTGGGCCTGCTGTTCA-3'	5'-CCAGCCTACTCATTGGGATCA-3'
KC	NM_008176	5'-GCTGGGATTACAC-3'	5'-TCTCCGTTACTTGG-3'
MIP-1 α	NM_011337	5'-ACCATGACACTCTGCAACCA-3'	5'-CCCAGGTCTCTTTGGAGTCA-3'
MIP-1 β	NM_013652	5'-GCCCTCTCTCTCCTCTTGCT-3'	5'-GTCTGCCTCTTTTGGTCAGG-3'
SDF-1	NM_013655	5'-GCGCTCTGCATCAGTGAC-3'	5'-TAATTTCTGGGTCAATGCACA-3'
Eotaxin	NM_011330	5'-TCCACAGCGCTTCTATTCCT-3'	5'-CTATGGCTTTTCAGGGTGCAT-3'
IL-6	NM_031168	5'-CCACGGCCTTCCCTACTTCA-3'	5'-TGCAAGTGCATCATCGTTGTTC-3'
EGR-1	NM_007913	5'-CAGGAGTTGGAGTGTGTGG-3'	5'-TATCCCATGGGCAATAGAGC-3'
TF	NM_010171	5'-ATGTGACCTGGGCCTATGAA-3'	5'-TTACTGGCTGTCCGAGGTTT-3'
ICAM-1	NM_010493	5'-GGGCTGGCATTGTTCTCTAA-3'	5'-TTCAGAGGCAGGAAACAGG-3'
VCAM-1	NM_011693	5'-CCCAAACAGAGGCAGAGTGT-3'	5'-CAGGATTTTGGGAGCTGGTA-3'
E-Selectin	NM_011345	5'-AGCTACCCATGGAACACGAC-3'	5'-CGCAAGTTCTCCAGCTGTT-3'
P-Selectin	NM_011347	5'-ATGCCTGGCTACTGGACACT-3'	5'-CTTCATCGCACATGAACTGG-3'
HO-1	NM_010442	5'-GCCACCAAGGAGGTACACAT-3'	5'-GCTTGTTGCGCTCTATCTCC-3'
CD68	NM_009853	5'-TGGGCCAAAGCTTCTGCTGT-3'	5'-GGAGGACCAGGCCAATGATG-3'
PBGD	NM_013551	5'-TCCCTGAAGGATGTGCCTAC-3'	5'-GCACTTTTCTCTGGCAAGGT-3'

3 Diskussion

3.1 Das Pluronic Mausmodell

Pluronic F127 ist ein thermoreversibles Poloxamer-Gel, welches in gekühltem Zustand flüssig ist, und sich bei Temperaturen > 25 °C gelförmig verfestigt. Pluronic hat eine amphiphile Molekularstruktur und formt in wässriger Lösung spontan Mizellen, welche als Vehikel für Medikamente und andere Substanzen dienen können (46). *In-vivo* kommt es zu einer langsamen Freisetzung der gelösten Verbindungen (47). In der vorliegenden Arbeit wurde dieses Gel verwendet, um die Wirkungen von Ox-PAPC, bzw. nicht-oxidiertem PAPC oder Lipopolysaccharid (LPS) an der *Arteria carotis communis* der Maus zu studieren. Diese Arterie ist mit wenigen Zellschichten so dünnwandig, dass eine Penetration der Lipide nach Applikation an der Adventitia gewährleistet ist. Darüber hinaus ist diese Arterie chirurgisch leicht zugänglich und kann mit minimaler Manipulation präpariert werden. In diesem Modell konnte erstmals gezeigt werden, dass Ox-PAPC, jedoch nicht PAPC, eine Reihe von Atherosklerose-assoziierten Genen *in-vivo* in der Gefäßwand aktiviert.

3.2 Induktion von Chemokinen durch Ox-PAPC

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Ox-PAPC die Chemokine JE, ein Homolog des humanen MCP-1, sowie KC, ein Homolog des humanen IL-8, in der Gefäßwand induziert. Die Immunhistochemie zeigte nach 24 Stunden ein homogenes Verteilungsmuster dieser Chemokine in der Arterienwand, eine Verteilung die auch in der Frühphase der Atherosklerose in der *Arteria carotis* von ApoE-Knockout-Mäusen nach 5-wöchiger „*Western type*“-Diät beobachtet wurde (48). MM-LDL und Ox-PAPC induzieren MCP-1 und IL-8 *in-vitro* in humanen aortalen Endothelzellen (49). Diese Wirkung wird größtenteils durch die Phospholipid-Komponente PEIPC und einem Cyclopentenon-Phospholipid vermittelt (50), welche in einem

Konzentrationsbereich von 100 nM wirksam waren. Im Vergleich dazu induzieren POVPC und PGPC diese Chemokine in einem Konzentrationsbereich von 5 μ M (50).

MCP-1 wird in humanen atherosklerotischen Läsionen exprimiert (51). MCP-1/JE wurde als der wesentliche Faktor in der MM-LDL induzierten Transmigration von Monozyten *in-vitro* identifiziert (52). Eine zentrale Rolle dieses Chemokins bei der Transmigration von Monozyten konnte auch im ApoE-Knockout Mausmodell durch den zusätzlichen Gen-Knockout des MCP-1/JE Rezeptors CCR2 gezeigt werden (53). Die CCR2/ApoE-Doppelknockout Mäuse wiesen bei gleichen Plasma-Lipidspiegeln eine signifikant geringere Atherosklerose auf (53).

Der Rezeptor für IL-8/KC, CXCR2, konnte in Makrophagen-reichen Arealen humaner atherosklerotischer Plaques gefunden werden (54). Knochenmarkstransplantation von CXCR2-Knockout-Mäusen in LDL-Rezeptor-Knockout-Mäuse, einem hyperlipidämischen Modell der Atherosklerose, resultiert in stark verminderter Ausprägung atherosklerotischer Läsionen mit verminderter Makrophageninfiltration in der proximalen Aorta (54). In der *ex-vivo* perfundierten *Arteria carotis* von ApoE-Knockout-Mäusen konnte KC als das wesentliche *Arrest*-Chemokin für rollende Monozyten identifiziert werden (48). Diese Wirkung wird durch Aktivierung des monozytären Integrins VLA-4 vermittelt (48).

Weiters konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt werden, dass Ox-PAPC die Chemokine *Macrophage inflammatory protein 1 α* und *1 β* (MIP-1 α , MIP-1 β) in der Arterienwand induziert. MIP-1 α und MIP-1 β gehören der CC-Chemokinfamilie an, sind chemotaktisch für Monozyten und Lymphozyten (55), und binden an den Chemokin-Rezeptor CCR5 (42). Eine Rolle für diesen Rezeptor konnte im ApoE-CCR5-Doppelknockout Mausmodell gezeigt werden, wo die Defizienz von CCR5 einen protektiven Effekt auf die Ausbildung atherosklerotischer Läsionen zeigte (56). MIP-1 β und CCR5 wurden in humanen atherosklerotischen Plaques in Koronararterien gefunden (57). MIP-

1 β erhöht darüber hinaus die *Tissue factor*-Aktivität in humanen aortalen Gefäßmuskelzellen, und wirkt somit pro-thrombotisch (57).

Drei weitere Atherosklerose-assoziierte Chemokine, *Regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted* (RANTES) (18), *Stromal cell-derived factor 1* (SDF-1) (42) sowie Eotaxin (58) wurden nicht von Ox-PAPC in der Arterienwand reguliert.

3.3 Arterielle Chemokin-Expression in der ApoE-Knockout Maus

Um das Ox-PAPC-spezifische Chemokin-Induktionsmuster mit jenem atherosklerotischer Arterien im ApoE-Knockout Mausmodell zu vergleichen, wurde die Expression der oben genannten Chemokine in der *Arteria carotis communis* von 12 Monate alten ApoE-Knockout Mäusen unter „Chow“-Diät mittels quantitativer RT-PCR bestimmt. Interessanterweise fand sich im Vergleich zu Wildtypmäusen ein ähnliches Expressionsmuster mit Induktion von JE, KC, sowie MIP-1 α und MIP-1 β , wogegen RANTES, SDF-1 und Eotaxin nicht differentiell reguliert waren. Bei der Interpretation dieses Ergebnisses ist hervorzuheben, dass die zelluläre Zusammensetzung der Arterienwand im ApoE-Knockout Mausmodell zu jener im Pluronic Mausmodell differiert, was durch eine Erhöhung des Makrophagen-Markers CD68 bei ApoE Knockout Mäusen im Vergleich zu Wildtypmäusen zum Ausdruck kommt. Es konnte aber gezeigt werden, dass Ox-PAPC im Mausmodell ein typisches atherogenes Chemokinmuster in residenten Zellen der Arterienwand induziert, was die Rolle oxidierte Phospholipide in der frühen Akquirierung von Monozyten in der Atherosklerose unterstreicht.

3.4 Ox-PAPC-induzierte Endothel-Monozyten-Interaktion

Nachdem KC als prinzipielles „Arrest“-Chemokin in der *ex-vivo* perfundierten *Arteria carotis* im ApoE-Knockout Mausmodell identifiziert wurde (48), konnte

angenommen werden, dass Ox-PAPC-induziertes KC eine ähnliche funktionelle Rolle in nativen Arterien spielen kann. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurde ebenfalls ein *ex-vivo* Perfusionsmodell herangezogen und native Arterien wurden mit Ox-PAPC stimuliert. Der resultierende signifikante Anstieg adhärenter Monozyten unter Fluss konnte durch einen gegen KC gerichteten Antikörper auf das Kontrollniveau reduziert werden. Somit fungiert KC auch in Ox-PAPC-stimulierten Arterien als „Arrest“-Chemokin. Huo und Kollegen konnten zeigen, dass diese Wirkung von KC durch Aktivierung des monozytären Integrins VLA-4 vermittelt wird (48). Zwei endotheliale Liganden für VLA-4 wurden beschrieben: VCAM-1 und die CS-1 Splice-Variante von Fibronektin (CS-1-FN) (59). Im Gegensatz zur löslichen Form von Fibronektin enthält die Zell-gebundene Form überwiegend die CS-1 Region (60). Die Blockade von VLA-4 durch kontinuierliche subkutane Verabreichung eines CS-1-Peptids in LDL-Rezeptor-Knockout Mäusen resultierte in einer signifikant verringerten Ausprägung atherosklerotischer Läsionen der proximalen Aorta (59), eine Beobachtung, welche die zentrale Rolle der KC-VLA-4 Interaktion in der Atherogenese unterstreicht. Analog konnte an humanen aortalen Endothelzellen *in-vitro* gezeigt werden, dass die MM-LDL-induzierte Monozyten-Bindung VLA-4-abhängig erfolgt (61). In diesem System konnte CS-1-FN als der wesentliche Ligand von VLA-4 identifiziert werden. MM-LDL bewirkte darüber hinaus eine Umverteilung und vermehrte Präsentation von CS-1-FN an der apikalen Zelloberfläche (61). Im Gegensatz zu LPS wurde durch MM-LDL die VCAM-1-Expression *in-vitro* nicht beeinflusst (61,62). Diese Beobachtung konnte in der hier vorliegenden Studie durch Ox-PAPC *in-vivo* bestätigt werden. Dies schließt eine Rolle für VCAM-1 als zusätzlichen VLA-4-Liganden im Zusammenhang mit oxidierten Phospholipiden jedoch nicht aus, da die endotheliale VCAM-1 Expression im ApoE-Knockout-Mausmodell selektiv an Prädilektionsstellen der Atherosklerose erhöht ist (45), was auch durch hämodynamische Faktoren erklärbar wäre (18).

Eine Voraussetzung für die feste Adhärenz von Monozyten unter Fluss ist das vorherige „Rollen“ an aktiviertem Endothel (44). In der *ex-vivo* perfundierten *Arteria carotis* von ApoE-Knockout-Mäusen konnte gezeigt werden, dass dieses monozytäre „Rollen“ abhängig von endotheliale P-Selektin bzw. dessen

Liganden *P-selectin glycoprotein ligand-1* (PSGL-1) erfolgt (63). Die wesentliche Rolle, die P-Selektin in der Atherogenese einnimmt wurde auch in ApoE-P-Selektin-Doppelknockout Mäusen demonstriert (64,65). Hier führte die Defizienz von P-Selektin zu einer signifikanten Verminderung atherosklerotischer Läsionen. Analog konnte in der vorliegenden Studie gezeigt werden, dass Ox-PAPC-induziertes monozytäres „Rolling“ ebenfalls P-Selektin-abhängig erfolgt. Die Vorbehandlung mit einem KC-blockierenden Antikörper führte zu einer Zunahme „rollender“ bei gleichzeitiger Abnahme fest adhärierender Monozyten. Dies wurde auch an atherosklerotischen Arterien von ApoE-Knockout Mäusen beobachtet (48,66). Die Expression von P-Selektin wurde nicht durch Ox-PAPC beeinflusst. In einer vorangegangenen Studie konnte jedoch gezeigt werden, dass oxidierte LDL *in-vitro* eine Translokation von P-Selektin aus Weibel-Palade-Körperchen an die Zelloberfläche hervorrufen (67).

Die Monozyten-Endothel-Interaktion, welche durch Ox-PAPC hervorgerufen wird weist somit funktionell große Ähnlichkeit zu jener in atherosklerotischen Arterien von ApoE-Knockout Mäusen auf. Dies stützt die Hypothese, dass oxidierten Phospholipiden aus subendothelial retiniertem MM-LDL eine wesentliche pathogenetische Rolle in der frühen Atherogenese zukommt.

3.5 Induktion weiterer Atherosklerose-assoziiierter Gene durch Ox-PAPC

3.5.1 Tissue factor und EGR-1

Tissue factor (TF) ist ein Membran-gebundenes Glykoprotein, welches den extrinsischen Pfad der Koagulationskaskade aktiviert und damit eine Schlüsselrolle in der Hämostase einnimmt (68,69). Unter physiologischen Bedingungen wird TF subendothelial von glatten Gefäßmuskelzellen und Fibroblasten der Adventitia exprimiert (70). Gefäßverletzungen führen zum Kontakt von TF mit Gerinnungsfaktoren des zirkulierenden Blutes, woraufhin ein hochaffiner Komplex mit Faktor VII und VIIa gebildet wird. Der TF-VIIa Komplex

aktiviert die Faktoren IX und X was seinerseits die Bildung von Thrombin bewirkt (69). Darüber hinaus kann TF von Leukozyten, glatten Gefäßmuskelzellen, sowie Endothelzellen als Antwort auf verschiedene pathologische Stimuli exprimiert werden (68). TF wurde in allen Stadien humaner atherosklerotischer Läsionen gefunden (69–71) und es wird angenommen, dass dies eine wesentliche Rolle für das Auftreten thrombotischer Komplikationen spielt (68). Es konnte gezeigt werden, dass MM-LDL und Ox-PAPC, sowie das darin enthaltene PGPC, TF in Endothelzellen *in-vitro* induzieren (72,73). Die Induktion von TF durch Ox-PAPC wurde durch den Transkriptionsfaktor *Early growth response gene-1* (EGR-1) vermittelt (72). Eine Überexpression von EGR-1 bzw. EGR-1-abhängigen Genen konnte in humanen atherosklerotischen Läsionen im Vergleich zu gesunden Gefäßabschnitten nachgewiesen werden (74). Dies war im LDL-Rezeptor-Knockout-Mausmodell replizierbar (74). Im Einklang mit den *in-vitro* Ergebnissen konnte in der vorliegenden Arbeit eine Induktion von TF und EGR-1 durch Ox-PAPC *in-vivo* gezeigt werden. Dies spricht für eine prothrombotische Wirkung oxidierter Phospholipide in atherosklerotischen Läsionen.

3.5.2 Interleukin-6

Interleukin-6 (IL-6) kann von einer Reihe von Zelltypen als Antwort auf verschiedene inflammatorische Stimuli gebildet werden, darunter Monozyten / Makrophagen, T-Zellen, Endothelzellen und glatte Gefäßmuskelzellen (75). Zu den wichtigsten biologischen Effekten von IL-6 gehören Proliferation und Differenzierung vom B- und T-Lymphozyten, sowie die Regulation der akuten – Phase-Reaktion (76). IL-6 wird in humanen atherosklerotischen Läsionen (77) sowie in solchen von ApoE-Knockout Mäusen (78) exprimiert. Organkulturen von isolierten Mäuseaorten zeigten überdies, dass IL-6 proportional zur Ausprägung atherosklerotischer Läsionen sezerniert wird (78). Die exogene Verabreichung von IL-6 führt in ApoE-Knockout Mäusen zu einer deutlich gesteigerten Ausprägung atherosklerotischer Läsionen (75). IL-6 potenziert die Zytokin-Sekretion von Makrophagen durch Stimuli wie LPS (79). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass IL-6 die Proliferation glatter

Gefäßmuskelzellen PDGF (*Platelet derived growth factor*)-abhängig stimuliert (80) und gerinnungsaktivierende Eigenschaften aufweist (81). In einer Fall-Kontroll-Studie wurden bei Patienten mit Myokardinfarkt erhöhte Plasma-Spiegel von IL-6 Jahre vor dem klinischen Ereignis gefunden (82). Mit jeder Quartile der Zunahme der IL-6 Plasmakonzentration erhöhte sich das Risiko eines zukünftigen Myokardinfarkts um 38%. Diese Ergebnisse lassen auf eine Rolle für dieses Zytokin in der frühen Atherosklerose schließen (82). Die Beobachtung in der hier vorliegenden Studie, dass Ox-PAPC in der nativen Arterienwand IL-6 induziert, zeigt einen möglichen Weg auf, wie oxidierte Phospholipide aus MM-LDL zur lokalen Expression und erhöhten Plasmaspiegeln in der Frühatherogenese beitragen können.

3.5.3 Hämoxygenase-1

Die Hämoxygenase ist das geschwindigkeitsbestimmende Enzym des Häm-Katabolismus, welches Häm zu Biliverdin, Eisen und Kohlenstoffmonoxyd abbaut (83). Die Hämoxygenase-1 (HO-1) ist die induzierbare Isoform, welche durch eine Reihe von Stimuli, wie Häm, Schwermetalle, UV-Licht, Cytokine und Endotoxin induziert werden kann (84). Über die Produkte Biliverdin und Kohlenstoffmonoxyd wirkt die HO-1 anti-oxidativ und anti-inflammatorisch (83). HO-1 wird in atherosklerotischen Läsionen von Menschen und ApoE-Knockout-Mäusen exprimiert (84). Es konnte gezeigt werden, dass MM-LDL und Ox-PAPC HO-1 in humanen Endothel- und glatten Gefäßmuskelzellen *in-vitro* induziert (83,85). In der vorliegenden Arbeit konnten diese Ergebnisse im *in-vivo* Modell bestätigt werden. Die Induktion der HO-1 durch oxidierte Phospholipide in der Arterienwand stellt somit einen Schutzmechanismus gegen die pro-inflammatorischen Wirkungen von Lipidoxidationsprodukten dar. Im ApoE-Knockout Mausmodell konnte gezeigt werden, dass es in der frühen Atherogenese zunächst zu einem Anstieg einer Reihe von anti-oxidativen Enzymen in der atherosklerotischen Arterienwand kommt, mit dem Fortschreiten der Läsionen jedoch eine konzertierte Abwärtsregulation der meisten dieser Enzymsysteme zu verzeichnen ist (86). Im Gegensatz dazu war die Expression der HO-1 dauerhaft erhöht (86), was vermutlich zumindest zum Teil auf die Induktion durch oxidierte Phospholipide zurückzuführen ist.

3.6 Ox-PAPC- versus LPS-induzierte Inflammation

Ox-PAPC induziert ein spezifisches Genexpressionsmuster, welches sich von anderen entzündlichen Mediatoren wie LPS unterscheidet (87). Insbesondere führt LPS zur Adhäsion von Monozyten und neutrophilen Granulozyten an Endothelzellen, während Ox-PAPC selektiv die Adhäsion von Monozyten induziert (32). Im Einklang mit vorangegangenen Studien konnte in der vorliegenden Arbeit dieses differenzielle Expressionsmuster im Vergleich zu LPS in der Arterienwand *in-vivo* repliziert werden. Dies stützt die Hypothese, dass oxidierten Phospholipiden eine Rolle in der Monozyten-spezifischen Inflammation in der Frühatherogenese zukommt.

3.7 Schlussfolgerungen

Zusammenfassend wurde ein Tiermodell etabliert, um die Wirkungen oxidierter Phospholipide auf die Arterienwand der Maus zu studieren. In diesem Modell konnte erstmals gezeigt werden, dass oxidierte Phospholipide, welche die biologische Aktivität von minimal oxidiertem LDL vermitteln, eine Reihe von Atherosklerose-assoziierten Genen in der nativen Gefäßwand *in-vivo* induzieren. Dies umfasst insbesondere Chemokine, welchen eine Rolle in der Rekrutierung mononukleärer Zellen in der Athrogenese zukommt. Das durch Ox-PAPC induzierte Chemokin-Expressionsmuster entsprach hierbei jenem von atherosklerotischen Arterien im ApoE-Knockout Mausmodell. Im *ex-vivo* perfundierten *Arteria carotis* Modell konnte KC, ein IL-8 Homolog, als das wesentliche Arrest-Chemokin bei der Rekrutierung von Monozyten durch Ox-PAPC identifiziert werden. Die initiale Monozyten-Endothelzell-Interaktion war hierbei P-Selektin-vermittelt. Dies repliziert die funktionellen Rollen von KC und P-Selektin in atherosklerotischen Arterien im hyperlipidämischen Mausmodell. Es kann daher angenommen werden, dass oxidierten Phospholipiden eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung von Monozyten in frühen atherosklerotischen Läsionen zukommt. Darüber hinaus induzierte Ox-PAPC IL-

6, ein pro-inflammatorisches Zytokin, sowie *Tissue factor*, einen wesentlichen Aktivator der Gerinnungskaskade. Neben der Rekrutierung von Monozyten sind somit weitere pro-inflammatorische und pro-thrombotische Wirkungen oxidierte Phospholipide in der Atherosklerose anzunehmen. Die Induktion der anti-oxidativ und anti-inflammatorisch wirksamen Hämoxxygenase-1 ist als Gegenregulation zu interpretieren, welche den Krankheitsprozess möglicherweise verlangsamt. Die differenzielle Genexpression zu einem typischen Mediator akuter Entzündung, bakterielles Lipopolysaccharid, weist auf die Spezifität der Monozyten-dominierten chronischen Entzündungsreaktion durch oxidierte Phospholipide hin.

4 Literaturverzeichnis

1. Wilkins E, Wilson L, Wickramasinghe K, Bhatnagar P, Leal J, Luengo-Fernandez R, Burns R, Rayner M, Townsend N. European Cardiovascular Disease Statistics 2017. European Heart Network, Brussels;
2. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. 1993 Apr 29;362(6423):801–9.
3. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000 Sep 14;407(6801):233–41.
4. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012 Sep;32(9):2045–51.
5. Tabas Ira, Williams Kevin Jon, Borén Jan. Subendothelial Lipoprotein Retention as the Initiating Process in Atherosclerosis. *Circulation*. 2007 Oct 16;116(16):1832–44.
6. Williams KJ, Tabas I. The Response-to-Retention Hypothesis of Early Atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995 May;15(5):551–61.
7. Cardoso L E, Mourão P A. Glycosaminoglycan fractions from human arteries presenting diverse susceptibilities to atherosclerosis have different binding affinities to plasma LDL. *Arterioscler Thromb J Vasc Biol*. 1994 Jan 1;14(1):115–24.
8. Galis ZS, Alavi MZ, Moore S. Co-Localization of Aortic Apolipoprotein B and Chondroitin Sulfate in an Injury Model of Atherosclerosis. 1993;142(5):7.
9. Witztum JL. The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *Lancet Lond Engl*. 1994 Sep 17;344(8925):793–5.
10. Berliner Judith A., Navab Mohamad, Fogelman Alan M., Frank Joy S., Demer Linda L., Edwards Peter A., et al. Atherosclerosis: Basic Mechanisms. *Circulation*. 1995 May 1;91(9):2488–96.
11. Nakashima Yutaka, Fujii Hiroshi, Sumiyoshi Shinji, Wight Thomas N., Sueishi Katsuo. Early Human Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007 May 1;27(5):1159–65.
12. Tabas I. Macrophage Apoptosis in Atherosclerosis: Consequences on Plaque Progression and the Role of Endoplasmic Reticulum Stress. *Antioxid Redox Signal*. 2009 Sep;11(9):2333–9.
13. Suzuki H, Kurihara Y, Takeya M, Kamada N, Kataoka M, Jishage K, et

- al. A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature*. 1997 Mar 20;386(6622):292–6.
14. Febbraio M, Podrez EA, Smith JD, Hajjar DP, Hazen SL, Hoff HF, et al. Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. *J Clin Invest*. 2000 Apr 15;105(8):1049–56.
15. Plump AS, Smith JD, Hayek T, Aalto-Setälä K, Walsh A, Verstuyft JG, et al. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell*. 1992 Oct 16;71(2):343–53.
16. Pendse AA, Arbones-Mainar JM, Johnson LA, Altenburg MK, Maeda N. Apolipoprotein E knock-out and knock-in mice: atherosclerosis, metabolic syndrome, and beyond. *J Lipid Res*. 2009 Apr;50 Suppl:S178-182.
17. Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross R. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb J Vasc Biol*. 1994 Jan;14(1):133–40.
18. McNeill E, Channon KM, Greaves DR. Inflammatory cell recruitment in cardiovascular disease: murine models and potential clinical applications. *Clin Sci*. 2010 Jun 1;118(11):641–55.
19. Hevonoja T, Pentikäinen MO, Hyvönen MT, Kovanen PT, Ala-Korpela M. Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: Basis for understanding molecular changes in modified LDL. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids*. 2000 Nov 15;1488(3):189–210.
20. Watson AD, Berliner JA, Hama SY, La Du BN, Faull KF, Fogelman AM, et al. Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest*. 1995 Dec;96(6):2882–91.
21. Navab M, Imes SS, Hama SY, Hough GP, Ross LA, Bork RW, et al. Monocyte transmigration induced by modification of low density lipoprotein in cocultures of human aortic wall cells is due to induction of monocyte chemotactic protein 1 synthesis and is abolished by high density lipoprotein. *J Clin Invest*. 1991 Dec;88(6):2039–46.
22. Witztum JL, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest*. 1991 Dec;88(6):1785–92.

23. Cyrus T, Witztum JL, Rader DJ, Tangirala R, Fazio S, Linton MF, et al. Disruption of the 12/15-lipoxygenase gene diminishes atherosclerosis in apo E-deficient mice. *J Clin Invest.* 1999 Jun 1;103(11):1597–604.
24. Watson AD, Leitinger N, Navab M, Faull KF, Hörkkö S, Witztum JL, et al. Structural Identification by Mass Spectrometry of Oxidized Phospholipids in Minimally Oxidized Low Density Lipoprotein That Induce Monocyte/Endothelial Interactions and Evidence for Their Presence in Vivo. *J Biol Chem.* 1997 May 23;272(21):13597–607.
25. Berliner JA, Territo MC, Sevanian A, Ramin S, Kim JA, Bamshad B, et al. Minimally modified low density lipoprotein stimulates monocyte endothelial interactions. *J Clin Invest.* 1990 Apr;85(4):1260–6.
26. Cushing SD, Berliner JA, Valente AJ, Territo MC, Navab M, Parhami F, et al. Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Jul;87(13):5134–8.
27. Rajavashisth TB, Andalibi A, Territo MC, Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, et al. Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins. *Nature.* 1990 Mar 15;344(6263):254–7.
28. Smith JD, Trogan E, Ginsberg M, Grigaux C, Tian J, Miyata M. Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci.* 1995 Aug 29;92(18):8264–8.
29. Watson AD, Navab M, Hama SY, Sevanian A, Prescott SM, Stafforini DM, et al. Effect of platelet activating factor-acetylhydrolase on the formation and action of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest.* 1995 Feb;95(2):774–82.
30. Watson AD, Subbanagounder G, Welsbie DS, Faull KF, Navab M, Jung ME, et al. Structural Identification of a Novel Pro-inflammatory Epoxyisoprostane Phospholipid in Mildly Oxidized Low Density Lipoprotein. *J Biol Chem.* 1999 Aug 27;274(35):24787–98.
31. Subbanagounder G, Leitinger N, Schwenke DC, Wong JW, Lee H, Rizza C, et al. Determinants of Bioactivity of Oxidized Phospholipids: Specific Oxidized Fatty Acyl Groups at the sn -2 Position. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*

2000 Oct;20(10):2248–54.

32. Leitinger N, Tyner TR, Oslund L, Rizza C, Subbanagounder G, Lee H, et al. Structurally similar oxidized phospholipids differentially regulate endothelial binding of monocytes and neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Oct 12;96(21):12010–5.
33. Walton KA, Hsieh X, Gharavi N, Wang S, Wang G, Yeh M, et al. Receptors Involved in the Oxidized 1-Palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine-mediated Synthesis of Interleukin-8 A ROLE FOR TOLL-LIKE RECEPTOR 4 AND A GLYCOSYLPHOSPHATIDYLINOSITOL-ANCHORED PROTEIN. *J Biol Chem*. 2003 Aug 8;278(32):29661–6.
34. Kadl A, Sharma PR, Chen W, Agrawal R, Meher AK, Rudraiah S, et al. Oxidized phospholipid-induced inflammation is mediated by Toll-like receptor 2. *Free Radic Biol Med*. 2011 Nov 15;51(10):1903–9.
35. Lee S, Birukov KG, Romanoski CE, Springstead JR, Lusis AJ, Berliner JA. Role of phospholipid oxidation products in atherosclerosis. *Circ Res*. 2012 Aug 31;111(6):778–99.
36. Edfeldt Kristina, Swedenborg Jesper, Hansson Göran K., Yan Zhong-qun. Expression of Toll-Like Receptors in Human Atherosclerotic Lesions. *Circulation*. 2002 Mar 12;105(10):1158–61.
37. Michelsen KS, Wong MH, Shah PK, Zhang W, Yano J, Doherty TM, et al. Lack of Toll-like receptor 4 or myeloid differentiation factor 88 reduces atherosclerosis and alters plaque phenotype in mice deficient in apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jul 20;101(29):10679–84.
38. Kiechl S, Oberhollenzer F. Toll-like Receptor 4 Polymorphisms and Atherogenesis. *N Engl J Med*. 2002;8.
39. Subbanagounder G, Wong JW, Lee H, Faull KF, Miller E, Witztum JL, et al. Epoxyisoprostane and Epoxycyclopentenone Phospholipids Regulate Monocyte Chemotactic Protein-1 and Interleukin-8 Synthesis: FORMATION OF THESE OXIDIZED PHOSPHOLIPIDS IN RESPONSE TO INTERLEUKIN-1 β . *J Biol Chem*. 2002 Mar 1;277(9):7271–81.
40. Gerszten RE, Garcia-Zepeda EA, Lim YC, Yoshida M, Ding HA, Gimbrone MA, et al. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature*. 1999 Apr 22;398(6729):718–23.

41. Boisvert WA, Santiago R, Curtiss LK, Terkeltaub RA. A leukocyte homologue of the IL-8 receptor CXCR-2 mediates the accumulation of macrophages in atherosclerotic lesions of LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest.* 1998 Jan 15;101(2):353–63.
42. van der Vorst EPC, Döring Y, Weber C. Chemokines and their receptors in Atherosclerosis. *J Mol Med Berl Ger.* 2015 Sep;93(9):963–71.
43. Zernecke A, Weber C. Chemokines in atherosclerosis: proceedings resumed. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014 Apr;34(4):742–50.
44. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol.* 2007 Sep;7(9):678–89.
45. Nakashima Yutaka, Raines Elaine W., Plump Andrew S., Breslow Jan L., Ross Russell. Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at Atherosclerosis-Prone Sites on the Endothelium in the ApoE-Deficient Mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998 May 1;18(5):842–51.
46. Sahu A, Kasoju N, Goswami P, Bora U. Encapsulation of curcumin in Pluronic block copolymer micelles for drug delivery applications. *J Biomater Appl.* 2011 Feb;25(6):619–39.
47. Hu Yanhua, Zou Yiping, Dietrich Hermann, Wick Georg, Xu Qingbo. Inhibition of Neointima Hyperplasia of Mouse Vein Grafts by Locally Applied Suramin. *Circulation.* 1999 Aug 24;100(8):861–8.
48. Huo Y, Weber C, Forlow SB, Sperandio M, Thatte J, Mack M, et al. The chemokine KC, but not monocyte chemoattractant protein-1, triggers monocyte arrest on early atherosclerotic endothelium. *J Clin Invest.* 2001 Nov 1;108(9):1307–14.
49. Lee Hans, Shi Weibin, Tontonoz Peter, Wang Shirley, Subbanagounder Ganesamoorthy, Hedrick Catherine C., et al. Role for Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α in Oxidized Phospholipid-Induced Synthesis of Monocyte Chemotactic Protein-1 and Interleukin-8 by Endothelial Cells. *Circ Res.* 2000 Sep 15;87(6):516–21.
50. Subbanagounder G, Wong JW, Lee H, Faull KF, Miller E, Witztum JL, et al. Epoxyisoprostane and Epoxycyclopentenone Phospholipids Regulate Monocyte Chemotactic Protein-1 and Interleukin-8 Synthesis. *J Biol Chem.* 2002 Mar 1;277(9):7271–81.

51. Nelken NA, Coughlin SR, Gordon D, Wilcox JN. Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques. *J Clin Invest.* 1991 Oct;88(4):1121–7.
52. Navab M, Imes SS, Hama SY, Hough GP, Ross LA, Bork RW, et al. Monocyte transmigration induced by modification of low density lipoprotein in cocultures of human aortic wall cells is due to induction of monocyte chemotactic protein 1 synthesis and is abolished by high density lipoprotein. *J Clin Invest.* 1991 Dec 1;88(6):2039–46.
53. Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF. Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature.* 1998 Aug 27;394(6696):894–7.
54. Boisvert WA, Santiago R, Curtiss LK, Terkeltaub RA. A leukocyte homologue of the IL-8 receptor CXCR-2 mediates the accumulation of macrophages in atherosclerotic lesions of LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest.* 1998 Jan 15;101(2):353–63.
55. Reape TJ, Groot PH. Chemokines and atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 1999 Dec;147(2):213–25.
56. Brauersreuther Vincent, Zerneck Alma, Arnaud Claire, Liehn Elisa A., Steffens Sabine, Shagdarsuren Erdenechimeg, et al. Ccr5 But Not Ccr1 Deficiency Reduces Development of Diet-Induced Atherosclerosis in Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007 Feb 1;27(2):373–9.
57. Schechter AD, Calderon TM, Berman AB, McManus CM, Fallon JT, Rossikhina M, et al. Human Vascular Smooth Muscle Cells Possess Functional CCR5. *J Biol Chem.* 2000 Feb 25;275(8):5466–71.
58. Haley KJ, Lilly CM, Yang JH, Feng Y, Kennedy SP, Turi TG, et al. Overexpression of eotaxin and the CCR3 receptor in human atherosclerosis: using genomic technology to identify a potential novel pathway of vascular inflammation. *Circulation.* 2000 Oct 31;102(18):2185–9.
59. Shih PT, Brennan M-L, Vora DK, Territo MC, Strahl D, Elices MJ, et al. Blocking Very Late Antigen-4 Integrin Decreases Leukocyte Entry and Fatty Streak Formation in Mice Fed an Atherogenic Diet. *Circ Res.* 1999 Feb 19;84(3):345–51.
60. Schwarzbauer JE. Selective secretion of alternatively spliced fibronectin variants. *J Cell Biol.* 1989 Dec 1;109(6):3445–53.

61. Shih PT, Elices MJ, Fang ZT, Ugarova TP, Strahl D, Territo MC, et al. Minimally modified low-density lipoprotein induces monocyte adhesion to endothelial connecting segment-1 by activating β 1 integrin. *J Clin Invest*. 1999 Mar 1;103(5):613–25.
62. Kim JA, Territo MC, Wayner E, Carlos TM, Parhami F, Smith CW, et al. Partial characterization of leukocyte binding molecules on endothelial cells induced by minimally oxidized LDL. *Arterioscler Thromb J Vasc Biol*. 1994 Mar;14(3):427–33.
63. Ramos Carroll L., Huo Yuqing, Jung Unsu, Ghosh Shukti, Manka David R., Sarembock Ian J., et al. Direct Demonstration of P-Selectin– and VCAM-1–Dependent Mononuclear Cell Rolling in Early Atherosclerotic Lesions of Apolipoprotein E–Deficient Mice. *Circ Res*. 1999 Jun 11;84(11):1237–44.
64. Collins RG, Velji R, Guevara NV, Hicks MJ, Chan L, Beaudet AL. P-Selectin or Intercellular Adhesion Molecule (Icam)-1 Deficiency Substantially Protects against Atherosclerosis in Apolipoprotein E–Deficient Mice. *J Exp Med*. 2000 Jan 3;191(1):189–94.
65. Dong ZM, Brown AA, Wagner DD. Prominent role of P-selectin in the development of advanced atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Circulation*. 2000 May 16;101(19):2290–5.
66. Huo Yuqing, Hafezi-Moghadam Ali, Ley Klaus. Role of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 and Fibronectin Connecting Segment-1 in Monocyte Rolling and Adhesion on Early Atherosclerotic Lesions. *Circ Res*. 2000 Jul 21;87(2):153–9.
67. Vora Devendra K., Fang Zhuang-Ting, Liva Stephanie M., Tyner Timothy R., Parhami Farhad, Watson Andrew D., et al. Induction of P-Selectin by Oxidized Lipoproteins. *Circ Res*. 1997 Jun 1;80(6):810–8.
68. Moons AHM, Levi M, Peters RJG. Tissue factor and coronary artery diseaseq. *Cardiovasc Res*. 2002;13.
69. Toschi Vincenzo, Gallo Richard, Lettino Maddalena, Fallon John T., Gertz S. David, Ferna´ndez-Ortiz Antonio, et al. Tissue Factor Modulates the Thrombogenicity of Human Atherosclerotic Plaques. *Circulation*. 1997 Feb 4;95(3):594–9.
70. Wilcox JN, Smith KM, Schwartz SM, Gordon D. Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. *Proc Natl*

Acad Sci. 1989 Apr 1;86(8):2839–43.

71. Hatakeyama K, Asada Y, Marutsuka K, Sato Y, Kamikubo Y, Sumiyoshi A. Localization and activity of tissue factor in human aortic atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis*. 1997 Sep;133(2):213–9.

72. Bochkov VN, Mechtcheriakova D, Lucerna M, Huber J, Malli R, Graier WF, et al. Oxidized phospholipids stimulate tissue factor expression in human endothelial cells via activation of ERK/EGR-1 and Ca^{++} /NFAT. *Blood*. 2002 Jan 1;99(1):199–206.

73. Drake TA, Hannani K, Fei HH, Lavi S, Berliner JA. Minimally oxidized low-density lipoprotein induces tissue factor expression in cultured human endothelial cells. *Am J Pathol*. 1991 Mar;138(3):601–7.

74. McCaffrey TA, Fu C, Du B, Eksinar S, Kent KC, Bush H, et al. High-level expression of Egr-1 and Egr-1-inducible genes in mouse and human atherosclerosis. *J Clin Invest*. 2000 Mar 1;105(5):653–62.

75. Huber S. A., Sakkinen P., Conze D., Hardin N., Tracy R. Interleukin-6 Exacerbates Early Atherosclerosis in Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999 Oct 1;19(10):2364–7.

76. Kopf M, Ramsay A, Brombacher F, Baumann H, Freer G, Galanos C, et al. Pleiotropic Defects of IL-6—deficient Mice Including Early Hematopoiesis, T and B Cell Function, and Acute Phase Responses. *Ann N Y Acad Sci*. 1995 Jul 1;762(1):308–18.

77. Kishikawa H, Shimokama T, Watanabe T. Localization of T lymphocytes and macrophages expressing IL-1, IL-2 receptor, IL-6 and TNF in human aortic intima. Role of cell-mediated immunity in human atherogenesis. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 1993;423(6):433–42.

78. Sukovich Drew A., Kauser Katalin, Shirley Francine D., DeVecchio Virginia, Halks-Miller Meredith, Rubanyi Gabor M. Expression of Interleukin-6 in Atherosclerotic Lesions of Male ApoE-Knockout Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998 Sep 1;18(9):1498–505.

79. Cochran FR, Finch-Arietta MB. Interleukin-6 can prime THP-1 macrophages for enhanced production of tumor necrosis factor- α in response to LPS. *Immunopharmacology*. 1992 Apr;23(2):97–103.

80. Ikeda U, Ikeda M, Oohara T, Oguchi A, Kamitani T, Tsuruya Y, et al. Interleukin 6 stimulates growth of vascular smooth muscle cells in a PDGF-

- dependent manner. *Am J Physiol.* 1991 May;260(5 Pt 2):H1713-1717.
81. Stouthard JM, Levi M, Hack CE, Veenhof CH, Romijn HA, Sauerwein HP, et al. Interleukin-6 stimulates coagulation, not fibrinolysis, in humans. *Thromb Haemost.* 1996 Nov;76(5):738–42.
82. Ridker Paul M., Rifai Nader, Stampfer Meir J., Hennekens Charles H. Plasma Concentration of Interleukin-6 and the Risk of Future Myocardial Infarction Among Apparently Healthy Men. *Circulation.* 2000 Apr 18;101(15):1767–72.
83. Krönke G, Bochkov VN, Huber J, Gruber F, Blüml S, Fürnkranz A, et al. Oxidized Phospholipids Induce Expression of Human Heme Oxygenase-1 Involving Activation of cAMP-responsive Element-binding Protein. *J Biol Chem.* 2003 Dec 19;278(51):51006–14.
84. Wang LJ, Lee TS, Lee FY, Pai RC, Chau LY. Expression of heme oxygenase-1 in atherosclerotic lesions. *Am J Pathol.* 1998 Mar;152(3):711–20.
85. Ishikawa K, Navab M, Leitinger N, Fogelman AM, Lusis AJ. Induction of heme oxygenase-1 inhibits the monocyte transmigration induced by mildly oxidized LDL. *J Clin Invest.* 1997 Sep 1;100(5):1209–16.
86. 't Hoen Peter A.C., Van der Lans Christian A.C., Van Eck Miranda, Bijsterbosch Martin K., Van Berkel Theo J.C., Twisk Jaap. Aorta of ApoE-Deficient Mice Responds to Atherogenic Stimuli by a Prelesional Increase and Subsequent Decrease in the Expression of Antioxidant Enzymes. *Circ Res.* 2003 Aug 8;93(3):262–9.
87. Kadl A, Huber J, Gruber F, Bochkov VN, Binder BR, Leitinger N. Analysis of inflammatory gene induction by oxidized phospholipids in vivo by quantitative real-time RT-PCR in comparison with effects of LPS. *Vascul Pharmacol.* 2002 Apr;38(4):219–27.