



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
UNIDAD XOCHIMILCO**

**“MECANISMO DE REGULACIÓN A LA BAJA DEL GEN
TRANSPORTADOR 1 CON CASETE DE UNIÓN A ATP
(ABCA1) EN MACRÓFAGOS PERITONEALES DE RATÓN
ACTIVADOS CON INTERFERÓN GAMA”**

T E S I S

Que para obtener el grado de Doctora en Ciencias Biológicas

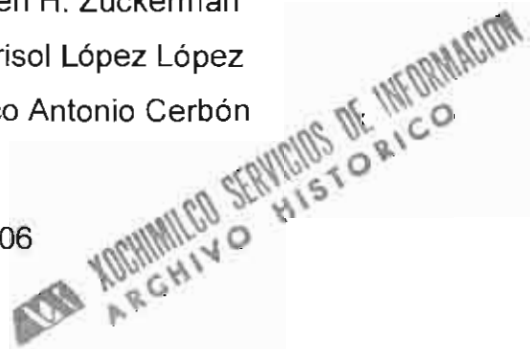
P R E S E N T A

M. en BE. MARTHA LETICIA ALFARO LEÓN

Comité Tutorial

Cotutores: Dr. Steven H. Zuckerman
Dra. Marisol López López
Asesor: Dr. Marco Antonio Cerbón

Febrero de 2006



El Doctorado de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el padrón de Posgrados de Excelencia de CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93

El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la salud de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó:

MARTHA LETICIA ALFARO LEÓN

El día 17 de febrero de 2006

Comité Tutorial:

Cotutor 1: Dr. Steven H. Zuckerman



Cotutor 2: Dra. Marisol López López




Asesor: Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes



Sinodal 1: Dr: Hector Fernando Serrano

Sinodal 2: Dr. Rafael Bojalil Parra



COMITÉ TUTORIAL

DIRECTORES DE TESIS

DR. STEVEN H. ZUCKERMAN

RESEARCH ADVISOR LILLY RESEARCH LABORATORIES ELI LILLY & CO.
ADJUNCT ASSOCIATE PROFESSOR DEPARTMENT OF MICROBIOLOGY &
IMMUNOLOGY. INDIANA UNIVERSITY SCHOOL OF MEDICINE

DRA. MARISOL LÓPEZ LÓPEZ

PROFESOR INVESTIGADOR TITULAR "C"
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
METROPOLITANA
UNIDAD XOXHIMILCO
SISTEMA NACIONAL DE INVESTIGACIÓN NIVEL I

ASESOR

DR. MARCO ANTONIO CERBÓN CERVANTES

PROFESOR TITULAR "C" DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MEXICO
SISTEMA NACIONAL DE INVESTIGACIÓN NIVEL III

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más profunda gratitud al Dr. Steven H. Zuckermann por su bondad, paciencia y eficiente claridad en la dirección diaria de este trabajo. Su labor de cuestionamiento sobre cada fase del proyecto, generó en mí inquietud e interés por resolver nuevas interrogantes, a la vez que fortaleció mi autoconfianza y me convenció del valor de mi formación científica. No tengo suficientes palabras para agradecer su benevolente dedicación y esfuerzo.

Expreso, también, mi gratitud a la Dra. Marisol López López por su solidaridad y orientación desinteresadas; al Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes por su apoyo; a la Dra. Ana María Rosales Torres por su invaluable cooperación, confianza y cariño en esta etapa importante de mi formación académica.

Fueron también fundamentales la orientación que me brindó el Dr. Glenn F. Evans en el trabajo del laboratorio y el apoyo de la Universidad Autónoma Metropolitana –tanto el Departamento de Producción Agrícola y Animal como el Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas Xochimilco/Iztapalapa- por las facilidades que me brindaron para la realización de mis estudios de doctorado.

El apoyo de los Laboratorios Eli Lilly merece también una mención en este espacio, pues su apoyo para la provisión del equipo, materiales y reactivos para la realización de los experimentos fue fundamental.

Finalmente, agradezco a la familia Salmerón por su cariño, apoyo y confianza.

A Alejandra Santiago y Gabriel por su eterna tolerancia y gran cariño

A mis queridas Alicias

“MECANISMO DE REGULACIÓN A LA BAJA DEL GEN TRANSPORTADOR 1 CON CASETE DE UNIÓN A ATP (ABCA1) EN MACRÓFAGOS PERITONEALES DE RATÓN ACTIVADOS CON INTERFERÓN GAMA”

Martha Leticia Alfaro León

Universidad Autónoma Metropolitana, 2006

Resumen

El Interferón gama (IFN- γ) regula a la baja los receptores asociados al transporte reverso de colesterol incluyendo ABCA1. En el presente estudio se determinó la cinética de la regulación a la baja de ABCA1 y si esta regulación está mediada por un proceso transcripcional o post-transcripcional. En este estudio se utilizaron macrófagos peritoneales de ratón, que cuando fueron estimulados con IFN- γ presentaron una disminución en la expresión del gen ABCA1 detectada después de 1 h de incubación con IFN- γ , registrándose la máxima reducción a las 3 h. Esta disminución en la expresión del gene fue dependiente de la síntesis de proteína *de novo*. Cuando se realizaron experimentos de ensayo de transcripción iniciada en éstas células tratadas con esta citocina, se detectó que la regulación a la baja de ABCA1 mediada por IFN- γ se realiza por medio de un proceso post-transcripcional. En las células tratadas con actinomicina D el mensajero de ABCA1 tuvo una vida media de 115 minutos, la cual fue reducida a 37 minutos en las células tratadas con IFN- γ . La disminución en la estabilidad del mensajero también fue asociada con una pérdida rápida de la proteína de ABCA1, que fue significativa después de 3 h de activación con IFN- γ . El incremento en la degradación de la proteína ABCA1 no fue bloqueado por los inhibidores de la función proteosomal y lisosomal. Estos hallazgos sugieren una nueva ruta de degradación para la proteína de ABCA1. La cinética del mensajero de ABCA1

correspondió a los cambios tempranos que Stat 1 experimentó en su fosforilación y translocación hacia el núcleo. Por lo tanto se puede considerar a *ABCA1* como un gen de respuesta temprana en macrófagos activados con IFN- γ y que su regulación a la baja se debe a la desestabilización del mensajero.

"MECHANISM(S) OF ABCA1 DOWN-REGULATION BY IFN- γ IN MURINE PERITONEAL MACROPHAGES "

Martha Leticia Alfaro León

Universidad Autónoma Metropolitana, 2005

Abstract

Interferon gamma (IFN- γ) down-regulates receptors associated with reverse cholesterol transport including ABCA1. In the present study, the kinetics of ABCA1 down-regulation and whether these effects were through transcriptional or post-transcriptional regulation was determined. IFN- γ stimulation of mouse peritoneal macrophages resulted in decreased ABCA1 message detected 1 hr following IFN- γ addition and was maximally reduced by 3 hrs. These effects were dependent on *de novo* protein synthesis and, based on nuclear run-on experiments, involved post-transcriptional regulation. ABCA1 message had a T $\frac{1}{2}$ of 115 minutes in actinomycin treated cells that was reduced to a T $\frac{1}{2}$ of 37 minutes by IFN- γ . The decrease in message stability was also associated with a rapid loss of ABCA1 protein that was significant 3 hrs following IFN- γ addition. The increased degradation of ABCA1 protein was not blocked by inhibiting proteasome or lysosomal function. This would suggest a novel pathway for ABCA1 protein degradation. The kinetics of ABCA1 message and protein decrease was consistent with the early IFN- γ induced changes in Stat1 phosphorylation and nuclear translocation observed in these cells. Therefore, ABCA1 can be considered as an early response gene to macrophage activation by IFN- γ with down regulation occurring by message destabilization.

INDICE GENERAL

CONTENIDO	página
1. INTRODUCCIÓN	1
1. Metabolismo del colesterol	1
1.2 Placa aterosclerótica	5
1.3 Participación del macrófago en la placa aterosclerótica	7
1.4 INF- γ	9
1.4.1 Ruta de señalización de INF- γ	10
1.4.2 Regulación de la expresión de INF- γ	14
1.4.3 Efectos de INF- γ en el tránsito de lípidos y colesterol	16
1.5 ABCA1	20
1.5.1 Estructura	21
1.5.2 Mecanismo de salida de colesterol mediado por ABCA1	25
1.5.3 Regulación de la expresión de ABCA1	
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	30
3. OBJETIVOS	32
4. HIPÓTESIS	33
5. MATERIAL Y METODOS	34
5.1 Estudios basados en RNA	35
5.1.1 Cinética de <i>ABCA1</i>	35
5.1.2 Estabilidad del mRNA del gen ABCA1	38

5.1.3.	Participación de síntesis de proteína <i>de novo</i> en la regulación a la baja de ABCA1	38
5.1.4	Ensayo de transcripción iniciada	39
5.1.5	Estudios basados en proteínas	43
5.2.1	Inmunotransferencias	43
5.2.2	Cinética de expresión de las proteínas STAT1 y STAT 1 fosforilada	44
5.2.3	Expresión de la proteína ABCA1 con diferentes bloqueadores de la proteólisis mediada por el sistema de ubiquitina- proteosoma	45
5.2.4	Expresión de la proteína ABCA1 con diferentes bloqueadores de la proteólisis mediada por los lisosomas	
3.2.5	Análisis estadístico	46
6.	RESULTADOS	47
7.	DISCUSIÓN	63
8.	CONCLUSIÓN	71
9.	BIBLIOGRAFÍA	72
10.	DIFUSIÓN DE LOS RESULTADOS	94

1.0 INTRODUCCIÓN

1.1 Metabolismo del colesterol

El colesterol es un componente esencial de la membrana citoplasmática, donde sus funciones son modular la fluidez de la membrana y mantener una barrera entre la célula y su medio ambiente. El colesterol también provee de material para la manufactura de ácidos biliares en los hepatocitos y hormonas esteroideas en tejidos esteroideogénicos. Una característica del colesterol es que su núcleo no es degradable, por lo que el mantenimiento de la homeostasis del *de novo* colesterol celular reside en el balance de la entrada en los alimentos y el sintetizado celularmente; requiere de una pérdida de colesterol en el cuerpo, principalmente por su transformación en ácidos biliares y eventualmente en la excreción fecal. Tanto el colesterol de la dieta, como el sintetizado *de novo* son transportados a través de la circulación por medio de partículas lipoproteicas, siendo ésteres de colesteril, la forma de almacenamiento del colesterol en la célula. A nivel celular la entrada de colesterol y su síntesis, así como el almacenamiento y salida debe ser un proceso altamente regulado para mantener su equilibrio. Si las células periféricas no tienen la capacidad de eliminar el exceso de colesterol libre no degradable (FC), el colesterol es esterificado y almacenado como gotas de éster de colesteril en el citoplasma (CE). Sin embargo este almacenamiento no es libre de peligro para el organismo; una de las primeras manifestaciones de una lesión aterosclerótica temprana es la presencia de células espumosas, formadas por macrófagos repletos de CE, los cuales

aumentan cuando los monocitos-macrófagos sanguíneos infiltran el endotelio y contribuyen a la patología de la enfermedad cardiovascular (1).

Las células periféricas obtienen el colesterol que proviene de la síntesis endógena y de lipoproteínas de baja densidad (LDL) circulantes. Las LDL son removidas del plasma por medio de la unión con los receptores de LDL que se acumulan en invaginaciones especializadas cubiertas de clatrina en la superficie celular. El LDL unido, es internalizado por medio de endocitosis y degradado en lisosomas para que el colesterol se libere (2). La síntesis celular de colesterol endógeno y el número de receptores-LDL (LDL-R) expresados en la superficie celular es regulado por un mecanismo de retroalimentación negativa por medio de los factores de transcripción unidos a membrana, llamados proteínas de unión a los elementos de respuesta a esteroides (SREBPs). Estas proteínas poseen un dominio amino terminal, que es liberado proteolíticamente por medio de un proceso complejo de translocación nuclear sensible al contenido de colesterol en la membrana. Cuando la concentración de colesterol en las células se eleva, la transcripción del LDL-R es suprimida para evitar la internalización excesiva de LDL; en contraste, cuando los niveles de colesterol disminuyen, se induce la transcripción del gen para aumentar la unión e internalización de LDL. Este mecanismo regulatorio sirve para mantener un nivel constante de colesterol no esterificado (3). Sin embargo, existen otros receptores para LDL, los receptores basurero o de recolección para LDL (SR-LDL), que a diferencia de los anteriores, no controlan su expresión por medio de los niveles intracelulares de colesterol, por lo que siguen internalizando colesterol sin límite alguno (4).

Las lipoproteínas de alta densidad (HDL) son una importante fuente de colesterol para el hígado y tejidos esteroideogénicos, además de desempeñar un papel muy importante en la salida de colesterol de los macrófagos hacia el hígado, mediante el

transporte reverso de colesterol para su posterior eliminación. Los receptores que reconocen estas HDL son los receptores basurero (SR) CD36 y BI (SR-BI) (5). El proceso de captación de HDL, por medio de estos receptores, es un proceso selectivo distinto al proceso de captación de LDL. En el caso de las LDL, su componente principal proteico, la apoproteína (apo) B100, es degradada en el lisosoma para liberar el colesterol, proceso que sigue a la endocitosis. A diferencia, en las HDL, el componente proteico principal, apo A-I, no se degrada, sino que se recicla (6).

Los receptores SR-BI se localizan en la invaginaciones libres de clatrina de la membrana celular, llamadas caveolas, cuya función es separar e integrar rutas de señalamiento transmembranales, sin pasar por alto su importancia en la homeostasis de colesterol. Las caveolas son los sitios aceptores para el colesterol sintetizado *de novo*, el cual es translocado desde el retículo endoplásmico (ER), o por captación selectiva mediante SR-BI. Se ha establecido que el dominio extracelular de SR-BI facilita la transferencia de lípidos HDL (7-8). Varios estudios han sugerido que las caveolas se pueden asociar con CE y anexina II en un complejo proteína-lípido que puede facilitar el transporte de CE desde las caveolas hasta las membranas internas, en este lugar el CE es hidrolizado por esterasas neutras para así liberar el colesterol hacia la membrana endosomal; mientras que las partículas de HDL y SR-BI no son recicladas de nuevo hacia la superficie (9).

Después de la captación de la lipoproteína y la hidrólisis lisosomal de CE, el colesterol no esterificado es transferido al RE, pero cuando se presenta en exceso es tóxico para la célula, y es entonces cuando la enzima acil-CoA: colesterol aciltransferasa (ACAT) es activada para promover la esterificación del colesterol y preservar la integridad de la membrana. Durante la esterificación se reduce la solubilidad de FC por medio de la agregación de largas cadenas de ácidos grasos, causando que CE

forme gotas de lípidos en el citoplasma. El CE citosólico es convertido de regreso a FC por la acción de la hidrolasa éster colesterol neutral (nCEH) que es activada por la proteína dependiente de AMPc, cinasa A (PKA). El colesterol liberado es transferido a la membrana plasmática donde puede ser transportado hacia el ER para otro ciclo de hidrólisis y esterificación. Sin embargo, en presencia de aceptores extracelulares de colesterol, como son apoA-I y HDL, este ciclo es interrumpido por la salida de FC de la célula (10-11).

Como se mencionó anteriormente, la regulación de la movilización de colesterol en los macrófagos no se autolimita, debido a los LDL-SR de los macrófagos, que rápidamente reconocen y engullen los LDL modificados, para la posterior degradación de lipoproteínas. El exceso de colesterol es esterificado por ACAT y forma gotas lipídicas citosólicas, que le dan al macrófago la apariencia característica de espuma en su interior, formándose de esta manera las células espumosas. Para que los macrófagos promuevan la salida de colesterol y prevenir así el desarrollo de células espumosas, esta célula debe desviar FC de la esterificación catalizada por ACAT así como promover la hidrólisis de CE por nCEH y transferir el FC a la membrana celular. La interacción de HDL-apo A-I con las proteínas de la superficie del macrófago parece promover cada uno de estos pasos (12-13).

La salida de colesterol de los macrófagos ha sido relacionada con la movilización de colesterol desde una poza de concentración intracelular que es utilizada por ACAT hacia otra poza de concentración específica para la salida de FC. Además AMPc, en presencia de HDL estimula la limpieza de CE en los macrófagos, posiblemente por la activación de la ruta PKA. PKA puede estimular a nCEH para promover la hidrólisis de CEs citosólicos, incrementando así la movilización de CE y la salida de FC mediada por apo A-I. Además el AMPc induce la expresión del ABCA1 (transportador 1 de

membrana con casete de unión a ATP, cuya función es mediar la salida de colesterol y fosfolípidos de los macrófagos mediante la interacción con HDL/apoA-I (14-16).

1.2 Placa aterosclerótica

El inicio de las lesiones ateroscleróticas suele producirse muy tempranamente en la vida de un individuo. Esta placa aterosclerótica es una lesión que se inicia cuando los monocitos se infiltran a través del endotelio vascular, hacia la íntima arterial respondiendo a la presencia de mediadores lipídicos y no lipídicos. A medida que la lesión evoluciona se observa la formación de células espumosas, provenientes de macrófagos y de células musculares lisas, deposición de matriz, daños a las células endoteliales, formación de trombos o coágulos de colesterol, necrosis celular y calcificaciones dañinas. En las lesiones avanzadas del proceso aterosclerótico se observa adherencia del trombo (17-19). Este tipo de lesiones comúnmente se encuentran en bifurcaciones y curvaturas de las arterias; es decir, en lugares donde el flujo sanguíneo es turbulento, contribuyendo a la disminución de la fuerza hemodinámica (20). La estría lipídica es la primera lesión reconocible, y está caracterizada por la presencia de macrófagos y de células espumosas derivadas del macrófago, así como también de células T y monocitos que se han infiltrado a través del endotelio debido a cambios en la superficie celular asociados con la activación y adhesión de leucocitos. El aumento de las proteínas de adhesión celular y la producción de quimiocinas promueven la infiltración de células mononucleares. La migración de las células de músculo liso de la túnica media de la lámina elástica interna al interior de la íntima tiene como resultado el engrosamiento de la misma y la

formación y proliferación de células espumosas derivadas de células de músculo liso. A medida que el proceso avanza, la duración y exacerbación de la patología en progreso está asociada con la elaboración de numerosos mediadores químicos de parte de los macrófagos activados y células T entre los que se encuentran factores de crecimiento, monocinas, tromboxanos, factor estimulante de colonias, quimiocinas e interferón gama (IFN- γ) (21-23). La presencia de lipoproteínas de baja densidad oxidadas (LDL-ox) y de peróxidos de lípidos contribuye a la formación de células espumosas, derivadas de macrófagos y de células de músculo liso, resultando en un aumento en la retención de lípidos y la formación de un núcleo lipídico necrótico (24-25). El progreso de la estría grasa hacia la formación de una lesión intermedia o avanzada se caracteriza por la formación de una cápsula fibrosa donde el colágeno sintetizado sustituye la matriz extracelular de la íntima por una capa fibrosa que rodea al núcleo lipídico, que en conjunto forma una placa que puede ser estable o en daños más avanzados ser inestable, pudiendo ocurrir la ruptura debido a la erosión de esta cápsula. Dicha erosión está frecuentemente asociada con la presencia de macrófagos localizados sobre esta cápsula que pueden secretar metaloproteinasas (MMP), lo que conlleva a su ruptura, seguido de una trombosis luminal, responsable de síndromes coronarios agudos, que obviamente se manifiestan clínicamente.

El progreso de la placa aterosclerótica se caracteriza por una patología cada vez más compleja, asociada con activación de macrófagos, de células T, de células endoteliales y de músculo liso (SMC) que producen grandes cantidades de citocinas, proteasas y lípidos oxidados, estableciendo un estado inflamatorio crónico que progresa hacia la manifestación de eventos clínicamente relevantes (26-28).

1.3 Participación del macrófago en la placa aterosclerótica

El fagocito mononuclear juega un papel crucial en todo el proceso de formación de la placa aterosclerótica, iniciando con la formación de la estría lipídica causada por la infiltración de monocitos y la generación de células espumosas en la íntima; esta estría se convierte en placa debido a un ambiente inflamatorio crónico que se establece a consecuencia de la elaboración de citocinas y cambios en el metabolismo de las lipoproteínas. Esta placa se desestabiliza mediante apoptosis para formar un núcleo necrótico dentro de la íntima, donde se localizan macrófagos que producen MMP y que finalmente provocan su ruptura debido a la erosión de la capa fibrosa (25,29).

Los macrófagos pueden contribuir a las modificación de lipoproteínas mediante su oxidación por medio de lipoxigenasas, óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) y NADPH oxidasas, para posteriormente ingerirlas (30-31).

Dependiendo del punto de vista, el macrófago puede desempeñar un papel pro-ateroesclerótico o anti-ateroesclerótico (22, 32). Puede ser considerado como protector por la elaboración de citocinas tales como el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el cual ha demostrado en estudios con conejos administrándoles FGF básico sistémico, una mejora en la función endotelial, reducción en la expresión de la molécula vascular de adhesión celular (VCAM-1) y en el número de macrófagos en la lesión aterosclerótica (33). El mismo papel protector se ha observado con el factor de crecimiento transformante B (TGFB) el cual incrementa la síntesis de ABCA1 y Apo E e inhibe la síntesis de MMP (34-36). La elaboración de TGF β y de



interleucina (IL) 10 (IL10) podría funcionar como un sistema de retroalimentación para reducir la activación de macrófagos (37).

A diferencia de lo anterior, el macrófago también puede participar como desestabilizador de la placa, por medio de la liberación de una gran variedad de productos que secreta, como por ejemplo: oxidantes, lipasas y citocinas tales como IL-1, IL-6, factor necrosante de tumor (TNF), IL-18, quimiocinas, CD40 y su ligando, y proteasas, tales como las MMP y las catepsinas D, S, K y L (38-39). Las catepsinas D, S, K y L por ejemplo, se expresan en el interior de la lesión aterosclerótica y debido a su actividad elastolítica y colagenolítica pueden estimular la erosión de la placa (40-41). Los macrófagos también contribuyen a la evolución de la lesión al ser fuente productora de quimiocinas tales como IL-8, MCP-1 y fractalina que promueven la entrada continua de monocitos a la lesión aterosclerótica (42-43), además de la participación especial de IL-18 en la progresión de aterosclerosis debido a su habilidad de inducir directamente la producción de IFN- γ (44). La producción de oxígeno reactivo y de radicales de nitrógeno por parte del macrófago contribuye también al progreso de la placa al estimular la lesión vascular mediante la modificación de lipoproteínas y la inducción de la síntesis de MMP, mientras que la expresión de factor VII y de factor de tejido por parte del macrófago deja la lesión predispuesta a eventos trombóticos importantes (45).

1.4 IFN- γ

El interferón gama (IFN- γ) es el único integrante del tipo 2 de interferones y desempeña una función importante en todas las fases de la respuesta inflamatoria e inmunológica. Por mucho tiempo, se ha reconocido a esta citocina como el factor activador del macrófago producido por linfocitos que facilita la actividad tumoricida de estas células (46-47). Además del linfocito ayudador tipo 1 (Th1) CD4+, se han reportado otros tipos de células que secretan IFN- γ , entre ellas el linfocito citotóxico CD8+, el macrófago activado, las células naturales asesinas (NK), los linfocitos B y la célula del músculo liso vascular (48-49). Sin embargo, en el caso de la placa aterosclerótica, lo más probable es que el linfocito Th1 sea la fuente primordial de IFN- γ . Se ha reportado que las células T comprenden entre 10 y 20 % de la población celular en placas avanzadas en humanos y al parecer se acumulan en lugares donde hay susceptibilidad de ruptura de la placa y trombosis. Se ha demostrado la expresión de IFN- γ en lesiones ateroscleróticas, tanto en muestras clínicas como en modelos de aterosclerosis preclínica en ratón. La presencia de macrófagos al lado de linfocitos tipo Th1, la síntesis de IL-12 e IL-18 por parte del macrófago, la cual a su vez puede estimular la producción de IFN- γ y la producción potencial de IFN- γ por parte de las células de músculo liso, asegura que haya numerosas fuentes de IFN- γ en el interior de la placa aterosclerótica (50-52).

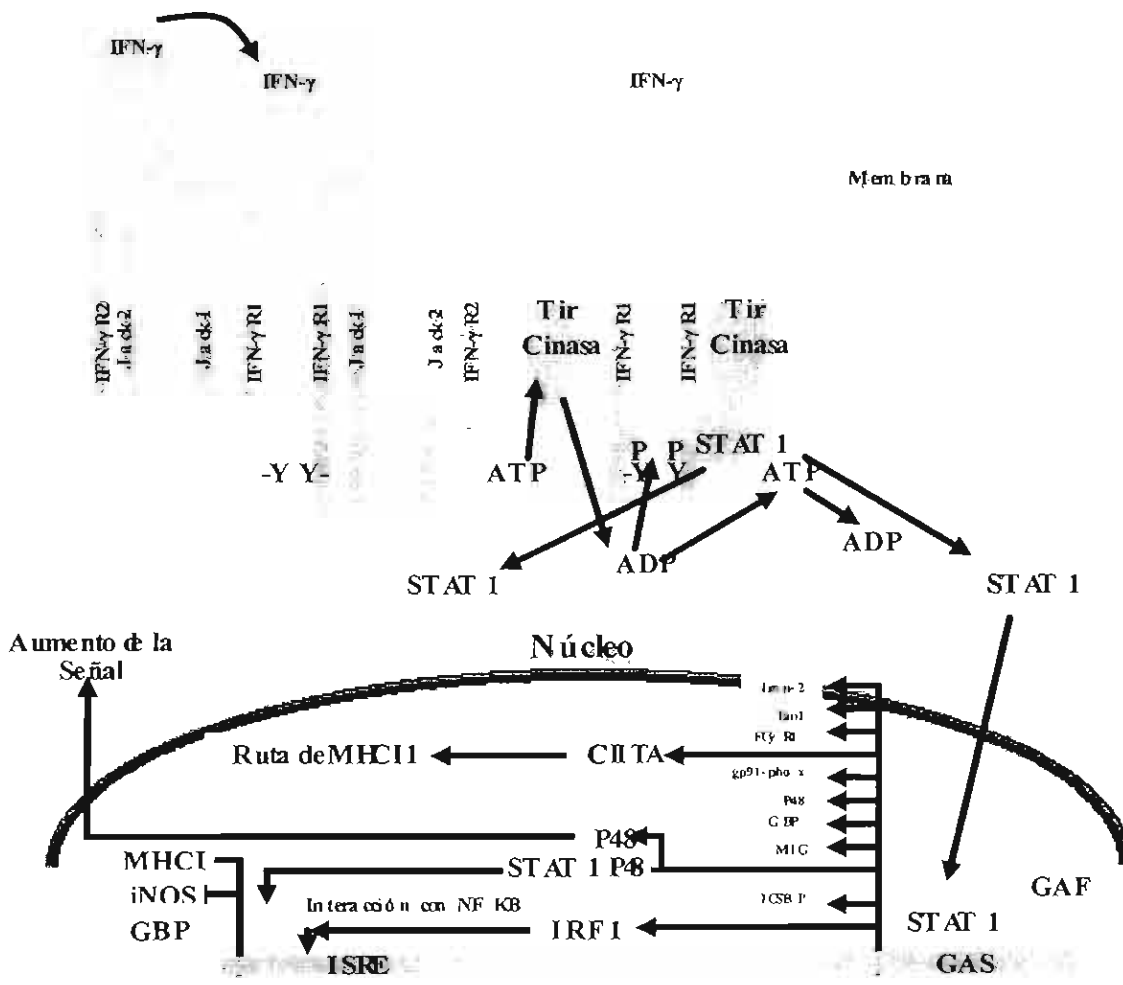
1.4.1 Ruta de señalización de IFN- γ

La señal celular mediada por IFN- γ comprende la unión de homodímeros de IFN- γ al complejo receptor de IFN- γ . El receptor es un miembro de la familia de receptores de citocinas clase II, consiste de dos cadenas de unión al ligando de 90-kDa o IFN- γ R1, asociadas con dos cadenas transductoras de la señal, o IFN- γ R2, que no participan en la unión del ligando de 85-kDa. El complejo receptor es ensamblado en la superficie celular sin requerir la unión con un ligando para que R1 y R2 se asocien. Ninguna de las cadenas del receptor tiene actividad intrínseca de cinasa, por lo tanto la transducción de la señal está mediada por secuencias que se encuentran en el motivo de unión del dominio intracelular de la cadena R1, las cuales se unen a la tirosina Janus cinasa 1 (Jak1) y a las proteínas transductoras de señales y activadoras de la transcripción (Stat1). La cadena R2 tiene una secuencia intracelular para la unión con la cinasa Jak2 (fig 1). Cuando IFN- γ se une al complejo receptor, Jak2 es autofosforilado (P-Jak2), el cual también fosforila a Jak1 en la cadena R1 P-Jak1, que a su vez fosforila residuos de tirosina críticos en R1 (residuo 440), permitiendo así la unión al dominio SH2 de Stat1. Cuando el dímero Stat1 se asocia con las cadenas de R1, es fosforilado en la tirosina 701, probablemente mediante la activación de Jak2. Se ha observado también fosforilación adicional de Stat1 mediante la ruta de fosfatidilinositol-cinasa AKT en la serina 727; dicha fosforilación contribuye a la transcripción de genes dependiente de Stat1 (53-59). El dímero P-Stat1 se disocia del complejo receptor, se transloca al núcleo y se une a las secuencias de activación de IFN- γ (GAS) en el sitio promotor del gen.

Además de los sitios donde se une Stat1 a promotores de activación de los genes que responden a IFN- γ , en esta ruta de señalización, también se transcriben otros factores activadores de transcripción con sus propios sitios de unión en el DNA que generan también cambios en la expresión genética. Los factores activadores mejor caracterizados son los IRF (factores reguladores de interferón), los cuales se unen a un sitio consenso IRF-E (47,60). Se ha demostrado que los factores IRF-1, 8 y 9 estimulan la transcripción de un subgrupo de genes inducibles por IFN- γ , mientras que IRF-2 antagoniza los genes inducibles por IRF-1 al unirse también al sitio de consenso IRF-E (61). La unión de IRF-1 con los genes inducibles de IFN- γ ocurre en un sitio promotor que no es el de Stat1, y se ha mostrado que estos dos factores de transcripción cooperan entre ellos resultando en una inducción máxima de los genes regulados por IFN- γ .

Mientras que la fosforilación de Stat1 y su translocación nuclear juegan un papel importante en la activación y represión de genes mediada por IFN- γ , los estudios en ratones deficientes en Stat1 revelan que IFN- γ puede también activar un subgrupo de genes mediante rutas no dependientes de Stat1 (62-63).

Se ha estudiado intensamente el mecanismo de señalización del IFN- γ vía Jak-Stat, sin embargo, IFN- γ puede activar otras señales, entre ellas las de cinasas MAP, de Src, ERKs y la ruta cinasa I κ B(IKK) (64-66). En estudios realizados en fibroblastos embrionarios de ratón deficiente en IKK alfa y beta, se reportó que un número importante de genes estimulados por IFN- γ no se inducían a pesar de



Boehm, U; et al 1997

Fig. 1. La señal celular mediada por IFN- γ se desencadena por la unión de homodímeros de IFN- γ al complejo receptor de IFN- γ formado por IFN- γ R1 y IFN- γ R2. El complejo receptor es ensamblado en la superficie celular sin requerir la unión con un ligando para que R1 y R2 se asocien. La transducción de la señal está mediada por la unión del dominio intracelular de la cadena R1 con la tirosina Janus cinasa 1 (Jak1) y con las proteínas transductoras de señales y activadoras de la transcripción (Stat1). Cuando IFN- γ se une al complejo receptor, Jak2 es autofosforilado (P-Jak2), el cual fosforila a Jak1 en la cadena R1. Jak1 fosforilado, a su vez fosforila residuos de tirosina en R1 (residuo 440), permitiendo así la unión al dominio SH2 de Stat1. Cuando el dímero Stat1 se asocia con las cadenas de R1, se fosforila en la tirosina 701. El dímero P-Stat1 se disocia del complejo receptor, se transloca al núcleo donde se une a las secuencias de activación de IFN- γ (GAS) en el sitio promotor del gen activando o inhibiendo su transcripción.

observarse un aumento en la transcripción de Stat1 (67). De hecho, lo más probable es que una citocina que tiene un papel tan importante en la inmunidad innata como lo tiene IFN- γ haya desarrollado en el camino de la evolución numerosas vías de señalamiento a fin de asegurar la supervivencia del huésped.

1.4.2 Regulación de la expresión de IFN- γ

La regulación negativa del mecanismo de señalización de IFN- γ parece estar modulada por la inducción de la familia de proteínas SOCS (supresores de señalización mediada por citocinas), primordialmente SOCS-1, así como ciertas proteínas sulfhidrilo tirosina fosfatasas, entre ellas Shp-1 y 2 (68-69). Ambos mecanismos tienen como resultado la inhibición del mecanismo de señalización vía Stat1 y en modelos de ratón con delección de SOCS-1 o Shp-1 se caracterizan por respuestas inflamatorias sistémicas severas. Se ha demostrado en estudios *in vitro* que SOCS-1 se une a Jak2 inhibiendo de esta manera la cinasa y con ello la fosforilación de Stat1. Es posible que la variante de la proteína SOCS-1 interactúe con Jak2 después de unirse a la subunidad IFN- γ R1, ya que una mutación de la tirosina 441 de la cadena IFN- γ R1 bloquea la unión de SOCS-1 al complejo R1-Jak2 e inhibe la activación de Stat1. Se puede deducir entonces, que la rápida inducción de SOCS-1 por IFN- γ sirve como un mecanismo de retroalimentación negativa para limitar la activación celular estimulada por el IFN- γ (70-71).

Se ha reportado también que la familia de proteínas tirosina fosfatasas inhibe la transducción del mecanismo de señalización de IFN- γ . Por ejemplo, se ha demostrado

que la Shp-2 se une directamente al complejo IFN- γ R1 e inhibe la activación de Stat1 (72). Mientras que en este estudio la Shp-2 no parece modular directamente el nivel de fosforilación del complejo IFN- γ R1, la fosforilación de Jak1 aumentó en células carentes de Shp-2. Se ha descrito una proteína inhibidora de Stat1 (PIAS-1), la cual se une a Stat1 e inhibe la asociación del dímero con DNA (73), este puede ser un mecanismo adicional que contribuye a la inhibición del mecanismo de señalización de Stat1. Por lo tanto, tanto la inducción de la expresión de la familia de las proteínas SOCS y la inhibición de la fosforilación de Stat1 representan formas de retroalimentación que inhiben la expresión de un subgrupo de genes inducibles por IFN- γ .

A pesar de que la expresión de los genes de las proteínas SOCS-1, 2, y 3 es inducida por IFN- γ , al parecer, la proteína SOCS-1 es el inhibidor más potente del mecanismo de señalización vía Stat1 que las proteínas SOCS-3 y SOCS-2, las cuales no tienen ningún efecto sobre la fosforilación de Stat1 inducida por IFN- γ (74-75).

La inhibición del mecanismo de señalización de IFN- γ por citocinas asociadas con las células Th2, entre ellas la IL-4 y la IL-10, representa un mecanismo compensatorio distinto para limitar el proceso inflamatorio. Cuando se trataron monocitos periféricos humanos con IL-10 antes de la estimulación con IFN- γ se inhibió la inducción de ICAM-1 y de la quimiocina IP-10, mientras que no hubo inhibición de IRF-1 mediada por IFN- γ . Ambos efectos ocurrieron por medio de la inhibición de la fosforilación de Stat1 así como también debido a la inducción de la expresión de SOCS-3 (76).

Finalmente, mientras que el mecanismo de señalización de IFN- γ se debe a su interacción con receptores de alta afinidad, el IFN- γ también puede unirse con menor

afinidad a proteoglicanos de condroitín sulfato en general y de manera específica con CD44 en células de músculo liso de tejidos vasculares humanos (77-78).

1.4.3 Efectos de IFN- γ en el tránsito de lípidos y colesterol

Se conocen alrededor de 500 genes que son regulados por IFN- γ , tanto por vías dependientes de Stat1 como por vías independientes del mismo (46). El espectro de genes relevantes en la homeostasis de lípidos que se regulan por IFN- γ , ya sea aumentando o disminuyendo su expresión, incluye genes de marcadores y receptores de superficie celular, proteasas, proteínas de la matriz extracelular, mediadores secretados, lipasas y oxidasas, así como también enzimas intracelulares y factores de transcripción. Estos cambios en la expresión de genes pueden ser considerados en dos clases funcionales: aquellos asociados con efectos directos sobre el colesterol o el tránsito de lípidos en la lesión aterosclerótica y aquellos cambios genéticos asociados en dirección al proceso inflamatorio. Debe considerarse que esta clasificación es artificial y que no existe el límite entre una y otra función genética, ya que un mismo gene puede participar en ambos grupos, como es el caso de los receptores recolectores que además de desempeñar el papel de ingesta de LDL modificados (directamente en la homeostasis de lípidos), también son receptores para otros ligandos como células apoptóticas, como el receptor basurero para fosfatidilserina y ox-LDL (SR-PSOX) que también funciona como una quimiocina (79).

Detallando acerca de los genes involucrados en el equilibrio de lípidos, existen estudios *in vitro* que muestran la regulación a la baja de receptores recolectores, entre

ellos SR-A y CD36 en macrófagos tratados con IFN- γ (80-82). Dado que el colesterol exógeno no disminuye la expresión de estos receptores, se sugiere que el IFN- γ debería reducir la formación de células espumosas mediante una reducción de la expresión de los receptores recolectores resultando así en una disminución también en el número de células espumosas en el interior de la placa arteroesclerótica. Esto permite plantear la posibilidad de que, mediante la modulación de los receptores recolectores, el IFN- γ pueda incrementar el número de células espumosas derivadas de células de músculo liso a expensas de las derivadas de macrófagos. En contraste con la regulación a la baja de los receptores recolectores SR-A y CD36, se ha reportado un sitio en el promotor de SR-A potencialmente activado vía IFN- γ , siendo detectado el aumento en la expresión de este receptor en monocitos humanos y cultivos de SMC vascular (81,83). Por lo tanto, es posible que IFN- γ pueda, en base a la modulación de receptores recolectores, incrementar la cantidad de células espumosas provenientes de SMC a expensas de aquellas células espumosas derivadas de macrófagos.

En contraste con la expresión de SR-A, IFN- γ incrementa la expresión de SR-PSOX en monocitos humanos y en células THP-1, tanto a nivel de proteína como a nivel de RNA mensajero (79).

Se ha demostrado en estudios *in vitro* que IFN- γ también tiene un efecto de regulación a la baja sobre otros receptores lipoproteicos del macrófago, entre ellos se encuentra la proteína relacionada con el receptor LDL (LRP), y el propio receptor de VLDL junto con el receptor de lipoproteína a y apoproteína a (Lpa(a)/apo(a)) (84-86). También se ha reportado que el IFN- γ causa una disminución en la expresión de ABCA1 en macrófagos de ratón y de células espumosas derivadas de macrófagos que

corresponde a una disminución de la salida de colesterol de las células (87). Por lo tanto, parece ser que el IFN- γ tiene un efecto de regulación negativa en el número de receptores involucrados en el tráfico de colesterol en la célula espumosa, aunque los resultados sean distintos cuando se evalúan estos mismos receptores en células vasculares de músculo liso.

IFN- γ causa también una disminución de la síntesis de la lipoproteína lipasa, de apoE (88-89), de la síntesis de colesterol 27-hidroxilasa en macrófagos y en células endoteliales de la aorta en humanos (90-91), pero causa un aumento de la síntesis de acil-CoA:colesterol-O-aciltransferasa (ACAT) (82) y de la secreción de la fosfolipasa secretora del grupo IIA (s-PLA2) en el macrófago y en cultivos de células de músculo liso de arteria humana (92). La disminución de la síntesis y secreción de la lipoproteína lipasa y de la apoE podría resultar en una disminución en la remoción de LDL y de VLDL de la circulación o de la lesión, mientras que un aumento en la secreción de s-PLA2 podría contribuir en un aumento en la modificación de LDL y que el receptor de LDL no actúe como eliminador de estas partículas y en su lugar lo hagan los receptores basureros. La disminución de la síntesis de 27-hidroxilasa podría reducir la eliminación del colesterol de las células espumosas, ya que la hidroxilación de la molécula es el primer paso en el metabolismo del colesterol extrahepático (91). Finalmente, se podría esperar que aumentos de la actividad y expresión de ACAT estimulados por IFN- γ en macrófagos estimulara la acumulación de colesterol al aumentar la cantidad de éster de colesterol en la célula espumosa derivada del macrófago.

En cuanto al efecto de IFN- γ en los cambios en la expresión de genes asociados con inflamación, esta citocina parece tener una actividad más consistente en la respuesta

inflamatoria, particularmente en la regulación a la alta de receptores de membrana y productos secretados asociados con ella.

La expresión de IFN- γ en la lesión aterosclerótica parece dirigir la inmunidad adaptativa por medio del incremento en la expresión de los antígenos clases I y II, así como de los componentes necesarios para la presentación del antígeno dependiente de las células clásicas presentadoras, como son los monocitos-macrófagos y las células dendríticas, así como también de células que no pertenecen al grupo clásico de presentadoras de antígeno, como lo son las células endoteliales y las células de SMC vasculares (93-94).

Además de los efectos que provoca en la presentación de antígeno, IFN- γ también incrementa diferentes componentes de esta misma ruta. La catepsina S, el transportador asociado con el procesamiento del antígeno (TAP) y la proteína de la molécula de la subunidad proteosómica de bajo peso molecular (LMP) (95) son algunos ejemplos de la manera en que IFN- γ contribuye a la progresión de aterosclerosis por medio del reconocimiento de autoantígenos, como ocurre cuando las células T de la placa en humanos reconocen a los LDL oxidados como un autoantígeno, siendo también reportados en pacientes ateroscleróticos anticuerpos contra estos LDL oxidados (96-97). En relación a las células endoteliales, IFN- γ puede ser considerado como promovedor de cambios pro-inflamatorios de las células endoteliales, en estas células IFN- γ también induce en forma dependiente de Stat1 a TAP-1 y IRF1 y a la clase de antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (98).

Los cambios endoteliales inducidos por IFN- γ originan la infiltración de células mononucleares a través de la capa endotelial por medio de la inducción de moléculas

de adhesión celular tales como ICAM y VCAM-1. En hallazgos interesantes, se ha reportado que IFN- γ inhibe la inducción de selectinas E y P, que podría tener impacto en el reclutamiento de neutrófilos, así como la inhibición también de molécula de adhesión plaquetaria de células endoteliales 1(PECAM-1) (99-100). IFN- γ regula a la alta quimiocinas como proteína inducible 10 (IP-10), monocina inducible por IFN- γ (MIG) y quimioatrayente de células T inducido por IFN- γ (I-TAC). Cuando alguna de estas tres últimas quimiocinas se une al receptor CXCR3 de las células T en la lesión aterosclerótica, provoca una mayor acumulación de células Th1 en la lesión (101). Se suman a la secreción de las de quimiocinas el aumento de expresión que IFN- γ promueve en células endoteliales del receptor CD40 y su ligando, así como también en células de músculo liso y macrófagos, proporciona comprensión adicional del mecanismo por medio del cual IFN- γ exagera una respuesta inflamatoria (102).

1.5 ABCA1

El transportador 1 con casete de unión al ATP (ABCA1) pertenece a una gran familia de proteínas integrales de membrana conocidas como casete unido a ATP (ABCA1). Esta familia está altamente conservada, y está presente en eucariotes y procariotes. La función de estas proteínas es fundamental en el transporte de membrana translocando una gran variedad de substratos fuera y dentro de la célula, así como entre diferentes compartimentos celulares, dentro de estos substratos se encuentran aminoácidos, lípidos, lipopolisacáridos, iones, péptidos, sacáridos, metales, drogas y proteínas. Estas proteínas utilizan la energía derivada de la hidrólisis del ATP para

transportar substratos a través de la membrana en contra del gradiente de concentración. Se ha estimado que la hidrólisis de dos moléculas de ATP resulta en el transporte de una molécula de sustrato (103).

1.5.1 Estructura

ABCA1 es una proteína integral de membrana celular formada por 2261 aminoácidos (104,105). La proteína ABCA1 está formada por dos secciones de estructura similar, que se encuentran unidas covalentemente (figura 2). En cada una de estas secciones se encuentran dos dominios de unión al nucleótido (unión al ATP) (NBD) formados por dos motivos peptídicos que se encuentran en muchas proteínas que utilizan ATP, estos dominios se nombran Walker A y Walker B (NBD1 y NBD2), además de estar formado cada uno también por seis hélices transmembranales. En la parte central de la proteína se encuentran los dominios reguladores (RD), los cuales son segmentos altamente hidrofóbicos que se cree son los que interactúan directamente con la membrana plasmática. Se cree que la región amino-terminal (N-terminal) de la proteína presenta dos grandes hélices extracelulares altamente glicosiladas y unidas por enlaces de cisteína, además de estar orientada hacia el citoplasma (106-107). Se ha comprobado que el extremo carboxilo (C-terminal) de la proteína se encuentra ubicado en el citoplasma donde interactúa con proteínas (108). Estudios realizados por Fitzgerald y colaboradores (109), han demostrado que el motivo VFVNFA localizado en el carboxilo terminal es esencial para que la proteína cumpla con la función de salida de colesterol de la célula.

La especificidad del sustrato para cada transportador está determinada por la secuencia de aminoácidos en el dominio membranar (TMD); como resultado, existen pequeñas similitudes entre los dominios transmembranales de los transportadores ABCA (110).

En el humano el gen de ABCA1 está localizado en el cromosoma 9 (9q31) y consta de 147.5 kb de longitud, mientras que en el ratón está localizado en el cromosoma 4A5-B3 y consta de 123 kb de longitud. Ambas especies comparten el mismo número de exones e intrones siendo 50 y 49 respectivamente, y el marco abierto de lectura consiste de 6783 pares de bases (pb). El tamaño de los intrones varía entre 111 pb a 16 kb para el ratón y de 111 pb a 24 kb para el humano. *ABCA1* es altamente conservado, siendo 95.2% idéntico en estas dos especies (111). Se ha secuenciado el gen *ABCA1* humano encontrándose 1 153 pb en el promotor, 14 6581 pb de las secuencias que codifican además de los intrones y 1 kb de la región terminal 3'. La región codificadora en ambas especies inicia en parte del exón 2 y termina en el exón 49 (112). Cuando se ha estudiado el promotor, se han identificado múltiples motivos altamente conservados entre estas dos especies, que podrían ser sitios de unión potenciales para factores de transcripción como Stat, c-myc, GATA, SP1, Zinc Finger 202 (ZNF202), NFκB, proteína reguladora de la unión a esteroides (SREB) y proteínas activadoras AP-1, 2 y 4 (113). En esta misma región promotora, en el exón 1 del extremo 5', se han detectado secuencias de elementos DR4, que responden a esteroides (114).

Los exones 49 y 50 se han secuenciado y se ha encontrado que codifican 127 aminoácidos (aa 2135-2261) en el carboxilo terminal que, como se indicó

anteriormente, parte de ella se encuentra localizada en el citoplasma y que interactúa con proteínas participando en procesos intracelulares (108).

Generalmente *ABCA1* es expresado en tejidos involucrados en transporte y utilización de colesterol, en células inflamatorias incluyendo al macrófago, células T y células B. Los órganos donde *ABCA1* está altamente expresado en el humano y en el ratón son: placenta, hígado, pulmones, glándulas adrenales, tejido fetal, corazón, bazo, intestino delgado y cerebro; la alta expresión de *ABCA1* en estos tejidos es debida a los macrófagos residentes. El RNAm de *ABCA1* es detectado en macrófagos convertidos en células espumosas, en lesiones ateroscleróticas tempranas (115). La distribución celular de *ABCA1* ha sido reportada en la membrana plasmática y en compartimentos intracelulares, en donde es transportado mediante endosomas tempranos (116).

Aunque *ABCA1* ha sido reportado como mediador del transporte de diversos tipos de proteínas, tales como promotor de la secreción de α -tocoferol, apo E, e interleucina 1β (117-118), el papel más importante es el de mediar el transporte de colesterol y fosfolípidos a través de la membrana por medio de apolipoproteínas pobres en lípidos, específicamente apoA-I. Se han identificado varias mutaciones en el gen *ABCA1* que son responsables de la enfermedad de Tangier (TD). Esta mutación puede presentarse en individuos homocigotos o heterocigotos, siendo más severa en los primeros. Las personas que padecen esta enfermedad presentan desde niveles bajos de HDL (40-45%) hasta niveles no detectables de la lipoproteína, acumulación de células espumosas y la predisposición a enfermedades cardiovasculares (112-119).

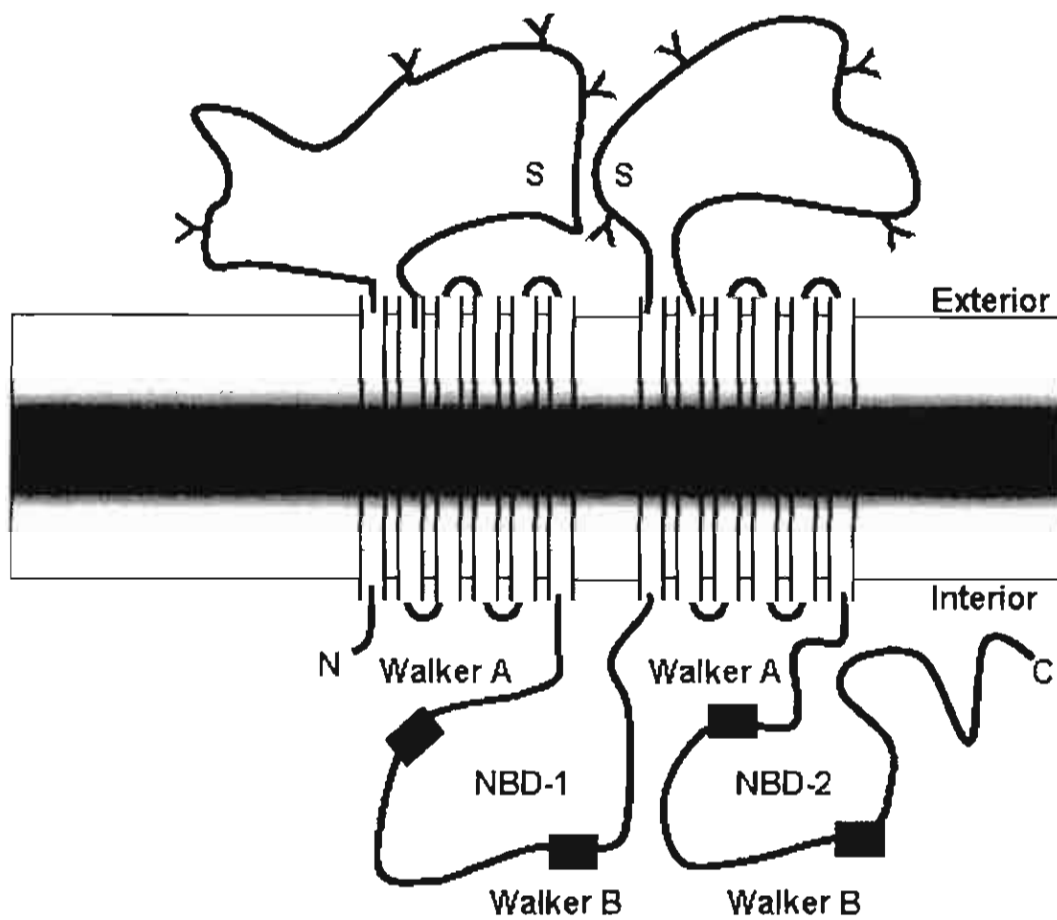


Figura 2. Modelo topológico de ABCA1. Las letras Y indican posibles sitios de glicosilación, S-S indica un posible enlace disulfuro. NBD-1 y NBD-2 indican los posibles dominios de unión al nucleótido que contiene las secuencias altamente conservadas Walker A y Walker B (Oram y cols, 2003).

1.5.2 Mecanismo de salida de colesterol mediado por ABCA1

Por medio de estudios realizados en microscopía electrónica y cristalografía de rayos-X de otros transportadores ABC, se han generado modelos que pueden ser aplicables a ABCA1 (120), siendo la proteína de resistencia a multidroga (MDR) ya caracterizada y, dada su homología con ABCA1, es la que se ha tomado como prototipo para explicar el mecanismo de transporte sugerido para ABCA1. Este modelo propone que las dos porciones simétricas transmembranales se juntan para formar una cámara que detecta los substratos de la cara interna de la membrana, los incorpora dentro de la cámara y los transloca hacia la cara externa para que la célula los pueda eliminar. Este mecanismo involucra una serie de cambios conformacionales en la proteína ABC, que probablemente están dirigidos por su dominio NBD (121). Trabajos recientes sugieren que el exceso de colesterol, junto con los fosfolípidos, se acumula en los dominios de la cara citosólica de la membrana o de las vesículas membranales intracelulares. Este colesterol no es accesible a las apolipoproteínas y, por eso, debe ser translocado a la superficie celular o dentro de la luz vesicular para poder ser removido (122).

Estudios realizados en transportadores de lípidos ABC en bacterias (MsbA) sugieren que la cámara transmembrana es inicialmente abierta en la parte intracelular (fondo), entonces los lípidos en la cara interna de la membrana son lateralmente transportados dentro de la cámara por medio de un proceso que es facilitado por sitios de alta afinidad de unión a fosfolípidos. Este reconocimiento de fosfolípidos induce la unión de ATP a los NBDs, los cuales promueven su dimerización y cierran así la cámara. Esta interacción de los grupos polares con los aminoácidos provoca la translocación de los lípidos atrapados en la luz hacia la cara externa de la membrana.

En este proceso la hidrólisis de ATP por los NBDs forma una unión de ADP intermedia que cambia la conformación de los dominios transmembranales provocando la apertura de la cámara en la cara externa de la membrana, seguido de una reducción en la afinidad por los fosfolípidos unidos. Los lípidos son, entonces, lanzados de la cámara hacia los dominios ricos en colesterol de la superficie celular, donde son unidos y solubilizados por apolipoproteínas para formar partículas nacientes de HDL. La estructura de la cámara de ABCA1 revierte su conformación para la siguiente entrada de sustrato después de la disociación del ADP de los NBDs (120).

En estudios se ha mostrado que ABCA1 forma oligómeros en las membranas plasmática e intracelular y que el homotetrámero es la unidad de mayor funcionalidad (123). También se ha postulado que la interacción de apolipoproteínas con cada una de estas unidades pueden ser las responsables de la generación de partículas de HDL nacientes conteniendo 4 ó más moléculas de apolipoproteína por partícula. La unión de apolipoproteínas con ABCA1 no parece ser requerida para su oligomerización. La estructura oligomérica funcional de ABCA1 es consistente con la observada para otros transportadores ABC (124).

1.5.3 Regulación del gen *ABCA1*

La transcripción y expresión del gen *ABCA1* en la superficie celular es controlada finamente y está marcadamente inducida en macrófagos con alto contenido de colesterol. Esta inducción ocurre exclusivamente a través del receptor nuclear receptor X de hígado (*liver X receptor*) (LXR) y del receptor X retinoide (*retinoic X receptor*) (RXR), y es revertida cuando las células agotan su colesterol por

medio de la incubación con HDL. Los receptores nucleares son factores de transcripción intracelulares que cuando son activados por medio de la unión de pequeños ligandos hidrofóbicos encienden genes blanco, entre estos ligandos se incluyen metabolitos generados por la misma célula. El LXR solamente estimula promotores cuando se encuentra en forma de heterodímero con RXR. Los oxisteroles, tales como 14-epoxicolesterol y 22-hidrocolesterol son ligandos fisiológicos para LXR. Ellos permiten al heterodímero LXR-RXR el reconocimiento del motivo en el promotor de *ABCA1* para aumentar su expresión (125-126). Este motivo está constituido por dos secuencias repetidas de 6 nucleótidos y espaciadas una de otra por 4 nucleótidos conocidos como DR4, encontrándose estas repeticiones en una región cercana al promotor de gen *ABCA1* (127). El LXR y el RXR son activados mediante la unión con oxisteroles y ácido retinoico, respectivamente; la transcripción, resultado de esta activación, comienza con la unión de cualquiera de uno o ambos ligandos. Las células tratadas con oxisteroles o con 9-cis ácido retinoico expresan *ABCA1*, pero la combinación de ellas tiene un efecto sinérgico en la expresión de este gen. El promotor del gen *LXR* en macrófagos humanos presenta un elemento de respuesta a LXR, indicando que *LXR* puede regular su propia expresión. El colesterol debe convertirse en oxisterol antes de activar la expresión de *ABCA1*, actuando este oxisterol como segundo mensajero en la señalización de la acumulación del exceso de colesterol en la membrana. Muchos de estos oxisteroles son generados por enzimas del citocromo P450 que se ubican en el hígado y que tienen un papel importante en la síntesis de la bilis. Además de los esteroides, los metabolitos de lípidos pueden modular la expresión de *ABCA1* por medio del sistema LXR. Los ácidos grasos poliinsaturados actúan como antagonistas

de la unión de los oxisteroles a los elementos de respuesta del gen *LXR*, interfiriendo en la inducción de *ABCA1* mediada por oxisteroles (128).

Además de la regulación de esteroides en la expresión génica de *ABCA1*, otros metabolitos, como AMPc y agonistas del receptor nuclear de proliferación del peroxisoma (PPAR), también modulan este proceso. Células RAW264 tratadas con 8-Br-AMPc presentaron también un incremento paralelo del RNAm y de la proteína de *ABCA1*, así como también la unión de *ABCA1* con apo-AI y la salida de colesterol mediada por apo-AI. Estos efectos reflejan un aumento en la transcripción de RNAm, más que estabilización del mensajero de *ABCA1* (129). Sin embargo no se ha identificado el motivo regulador en el promotor del humano.

En macrófagos normales, los agonistas de PPAR α y PPAR β incrementan la expresión de RNAm de *ABCA1* y la salida de colesterol es realizada por medio de apo-AI; sin embargo este mecanismo no se observa en pacientes con la enfermedad de Tangier. Estos agonistas también inducen la expresión de RNAm de *LXR*, y como el promotor de *ABCA1* carece de elementos de respuesta a PPAR, parece que los agonistas de PPAR regulan a la alta la transcripción de *ABCA1* indirectamente, por medio de la activación de la ruta de LXR α (130).

Recientemente se ha identificado entre el exón 1 y el 2 del gen de *ABCA1* un segundo sitio de inicio de la transcripción, con un promotor que contiene sus propios elementos reguladores (131). Quizá en el futuro se pueda manipular este promotor, influyendo así en la expresión de *ABCA1*.

También existen mecanismos transcripcionales regulatorios, que pueden determinar la actividad funcional de ABCA1. En los diferentes tejidos existe una considerable discrepancia entre el RNAm y los niveles de proteínas de *ABCA1* (132).

Existen mecanismos de estabilidad de la proteína ABCA1 como el conferido por apoA-I, la cual la protege de la degradación proteolítica, así también como la mediada por diferentes metabolitos y el sistema de calpaina (133-134).

Existe un mecanismo de regulación de RNAm y proteína de ABCA1 relacionado con mediadores del proceso inflamatorio. Se ha reportado la regulación a la alta del mensajero y la proteína, mediada por el factor de crecimiento transformante β (TGF β) (35), a diferencia de la regulación a la baja dependiente de lipopolisacárido (LPS) (135) y de IFN- γ . Experimentos realizados en macrófagos peritoneales de ratón y células espumosas activados con IFN- γ , han reportado una regulación a la baja en la expresión del RNAm de *ABCA1*, que fue acompañada también de reducción en la salida de lípidos mediada por apoA-I. En este estudio se observó también reducción en la proteína (87). Este último mecanismo de regulación de la expresión de *ABCA1* es el motivo principal de estudio de esta tesis.

2.0 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En macrófagos existe un gran número de genes regulados por IFN- γ ; esta regulación es dependiente del tiempo de incubación, así como de la dosis utilizada. En estudios realizados con microarreglos se demostró que del 80% de los genes que presentaron cambios en su expresión, este cambio fue a la baja, a diferencia del 20% restante en que su cambio de expresión se manifestó a la alta (Alfaro, datos no publicados).

Estos genes que presentaron cambios en su expresión genética se pueden dividir en dos grupos dependiendo de la función desempeñada en el proceso aterosclerótico: Aquellos genes cuya función está asociada directamente con el proceso inflamatorio y no asociada con lípidos, y los genes que tienen una función directa en el tránsito de colesterol o lípidos en la lesión aterosclerótica. El gen *ABCA1* forma parte de éste último grupo, el cual codifica una proteína que regula la salida de lípidos de los macrófagos hacia las HDL, para su transporte hacia el hígado y su posterior excreción en forma de bilis, en un proceso llamado transporte reverso de colesterol.

En trabajos previos se ha demostrado que *ABCA1* es regulado a la baja en macrófagos de ratón activados con IFN- γ (87), y en estudios posteriores en macrófagos de ratones *Stat1 knockout*, se encontró que esta disminución en la expresión de *ABCA1* ocurre a través de la vía de señalización Jak-Stat (136). La regulación de *ABCA1* mediada por IFN- γ requiere de estudios más profundos para comprender el mecanismo por medio del cual este proceso se lleva a cabo y en un futuro poder manipularlo en pro de la disminución de la lesión aterosclerótica o para evitarla en su fase inicial.

Este estudio tuvo como objetivo la determinación del mecanismo involucrado en la regulación a la baja del gen *ABCA1* mediada por IFN- γ , para lo cual los experimentos se dividieron en dos grupos: estudios relacionados con la expresión del gen y estudios en dirección a la expresión de la proteína. Al inicio del proyecto, se plantearon una serie de interrogantes, que al darles respuesta nos conduciría a alcanzar nuestro objetivo. Este orden fue o no modificado dependiendo de los resultados de cada experimento. Iniciamos los estudios de la expresión del gen con una cinética de expresión para determinar si *ABCA1* es un gen de respuesta temprana o tardía, así como para conocer los tiempos óptimos en los cuales se realizarían los siguientes experimentos.

3.0 OBJETIVOS

Definir el mecanismo de regulación a la baja del gen ABCA1 mediado por IFN- γ .

Determinar la cinética de la regulación a la baja del gen ABCA1.

Definir si la regulación a la baja de gen ABCA1 mediada por IFN- γ es un proceso transcripcional o post-transcripcional.

Determinar si la proteína de ABCA1 está regulada a la baja mediante cinéticas similares.

4.0 HIPOTESIS

La regulación a la baja de ABCA1 mediada por IFN- γ es a través de la combinación de ambos mecanismos; transcripcionales y post-transcripcionales.

5.0 MATERIAL Y MÉTODOS

La mayoría de los compuestos y reactivos utilizados fueron de Invitrogen (Life Technologies CA, USA), el resto es especificado cuando es mencionado.

Cultivos Celulares:

Para todos los experimentos realizados durante el desarrollo de esta investigación se usaron ratones BALB/c (Taconic Germantown, NY) hembras de 45 días de edad, alimentados con alimento estándar (Purina) y agua ácida *ad libitum*. Los ratones estuvieron mantenidos en cajas con filtro en una habitación con luz y temperatura controladas.

Para obtener los macrófagos, los ratones fueron inyectados intraperitonealmente con 2 ml de medio de tioglicolato (Sigma-Aldrich St. Louis MO, USA) para promover la diferenciación y movilización de los macrófagos hacia el peritoneo. Los ratones fueron sacrificados a las 72 horas post-inyección con bióxido de carbono y los macrófagos se obtuvieron por medio de lavado peritoneal con 10 ml de medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco BRL, NY) suplementado con 2% de suero fetal bovino (Hyclone lab, Logan, UT).

La cuenta celular se realizó por medio de una cámara de Neubauer 1/400 mm² y 1/100mm de profundidad (Hausser & Son, Phil.). Una vez contados los macrófagos se sembraron en placas de 6 o 24 celdas o en frascos de cultivo con ventilación en la tapa de 75 o 150 cm². La densidad por frasco o placa fue dependiente del experimento a realizar. Antes de los tratamientos los macrófagos se incubaron por 24 h. a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO₂ para permitir su adherencia.

Los cultivos celulares siempre se incubaron con IFN- γ (Biosource International CA) a una concentración de 10 ng/ml.

En los experimentos realizados en macrófagos convertidos a células espumosas, se siguió el mismo protocolo, que consistió en incubar los macrófagos con LDL acetilados a una concentración de 25 μ g/ml en medio de cultivo RPMI 1640 y se incubaron por 48 horas, tiempo en el cual se verificó la transformación por microscopía.

5.1 Estudios basados en RNA

5.1.1 Cinética de *ABCA1*

Para el estudio de la cinética de expresión del gen *ABCA1*, se sembraron los macrófagos en placas de 6 celdas, a una densidad de 2×10^6 células por celda. Las células se incubaron con IFN- γ en los tiempos 0, 1, 3, 6, 24 y 48 h. a 37 °C al término de cada incubación las células se lisaron con el estuche *RNeasy* (Qiagen, CA) para aislar RNA total. A continuación se eliminaron los restos de DNA que pudieron haber permanecido en la muestra usando el estuche DNA-free (Ambion TX). Se sintetizó a partir del RNA total el DNA complementario (cDNA) usando el estuche *First Strand Synthesis System for RT-PCR*. Este cDNA se utilizó para la identificación y cuantificación de la secuencia correspondiente al gen *ABCA1*. La detección y cuantificación se realizó por medio del procedimiento tiempo real transcripción reversa cuantitativa de reacción en cadena de la polimerasa (Taqman RT-PCR). Este método

permite cuantificar en tiempo real los productos de la PCR por medio de la medición de la fluorescencia emitida por una sonda específica de transgén marcada con un fluorocromo no radioactivo. Para llevar a cabo la reacción se utilizó la reacción de *TaqMan Universal Master Mix* y el RNA ribosomal (RNAr) 18S como control endógeno. Los cebadores ABCA1F (ggtttgagatggtataacaatagttgt), ABCA1R (ttcccgaaacgcaagtc) y la sonda (6 FAM cgaatagcaggctccaaccctgacc TAMRA) fueron diseñados mediante el uso del programa Primer Express Software de la compañía Applied Biosystems (Foster city, CA) y construidos por Operon Biotechnologies (Huntsville, AL. La señal fluorescente fue monitoreada por el instrumento detector de secuencias Prisma modelo 7700 (PE Applied Biosystems Foster City, CA). Para el análisis de datos se utilizó el programa detector de secuencias SDS2. (Applied Biosystems Foster city, CA). De cada muestra se generó un esquema de amplificación y se calculó el valor del ciclo de umbral (Ct) como el número de ciclo al cual la emisión fluorescente del reportero es mayor que la emisión del nivel del umbral y es desplegada en una gráfica como el punto de intersección de la curva de amplificación con el umbral. El valor Ct es inversamente correlacionado con el nivel del RNA blanco y es automáticamente calculado por el programa SDS. Se graficó una curva estándar usando cantidades definidas de RNA de preparaciones control. Los datos de *ABCA1* fueron expresados como la proporción de la cantidad del mensajero de *ABCA1* contra la cantidad de RNA del mensajero del RNAr 18S, basados en sus respectivos valores Ct.

Para confirmar mediante otro método los resultados obtenidos en la cinética, se hicieron transferencias Northern. Para ello se sembraron macrófagos en frascos de cultivo de 150 cm² a una densidad de 2.6 X 10⁶ células/frasco con medio de cultivo

RPMI1640 (2% FBS). Los frascos fueron tratados con IFN- γ , a los tiempos 0, 1 y 3 horas. Posteriormente se aisló RNAm con el estuche *FastTrack 2.0*. Inmediatamente se separó 1 μ g de RNAm por medio de un gel al 1.2% de agarosa-formaldehído y se transfirió a una membrana de nylon Nytran, usando el sistema semiseco (Turboblotter Schleicher & Schuell Inc.). Terminada la transferencia, la membrana fue fijada con luz ultravioleta reticulada (crosslinked) (Stratagene) y posteriormente hibridada con la sonda marcada. Esta sonda fue marcada con [α -³²P]dATP (ICN Biomedical, Irvine, CA.) usando para ello el estuche *Random Primers DNA labeling System*. La membrana fue pre e hibridada con amortiguador para hibridización (0.75 M NaCl, 0.1M Na₂HPO₄, 0.1M Na H₂PO₄, 0.1% Na₄P₂O₇.10H₂O, 0.15M Tris-HCL pH 7.5, 5x solución Denhardt, 2% SDS, 100 mg/ml DNA fragmentado de esperma de salmón, 50% formamida) a 42 °C durante toda la noche. Al término de la hibridación las membranas se lavaron en solución de 1xSSC y SDS al 1% a 42 °C. Posteriormente se expusieron en una pantalla para fósforo (Phosphoscreen Molecular Dynamycs, Inc. Sunnyvale, CA) y se cuantificó por medio de un analizador de fósforo y el programa Imagen Quant 5.2 (Molecular Dynamycs, Inc. Sunnyvale, CA). La normalización fue realizada como la proporción del valor de la señal de ABCA1 contra el valor de la señal de S29. Los cebadores diseñados de ABCA1 y S29 para las sondas fueron: sentido 5'TGGCCAGTCTGTGTAACGGATCAA3' y antisentido 5'GATGCGGGACACTGCCTGGTAGAT3'. Sentido 5'TCTGAAGGCAAGATGGGTCACCA3' y antisentido 5'TTTGTGTACAAAGACTAGCATGAT3' respectivamente, los cuales fueron utilizados en el estuche Advantage DNA polymerase y purificados por medio de la columna de cromatografía CHROMA SPIN-200 DEPC-H₂O (Clontech). Palo Alto, CA) antes del proceso de hibridación.

5.1.2 Estabilidad del RNAm del gen *ABCA1*

Para llevar a cabo este experimento se sembraron macrófagos en placas de 6 celdas a una densidad de 2×10^6 células por celda. Los macrófagos fueron tratados con $5 \mu\text{g/ml}$ de actinomicina D, seguido de la activación o no con IFN- γ durante 0, 1, 3, 6, 24 y 48 horas.

El aislamiento de RNA y la cuantificación del mensajero se realizó por medio de PCR cuantitativo en tiempo real de la manera anteriormente descrita.

5.1.3 Participación de síntesis de proteína *de novo* en la regulación a la baja de *ABCA1*.

Antes de ejecutar el experimento se hizo un ensayo con diferentes concentraciones de cicloheximida (Sigma-Aldrich St. Louis MO, USA) para tener la certeza de inhibir la síntesis de proteína. Este ensayo consistió en medir la incorporación de leucina marcada (^3H -leucine (1mCi/ml)) (Sigma-Aldrich St. Louis MO, USA) en macrófagos incubados en un medio carente de este aminoácido. Las células se lisaron y se precipitaron las proteínas con ácido tricloracético en un microdisco de fibra de vidrio (Millipore Billerica, MA) y se les midió la radioactividad por medio de un contador de centelleo (Beckman Coulter, Fullerton CA). El resultado obtenido fue que

con una concentración de 5 μ M de cicloheximida se inhibió el 95% de la síntesis proteica.

Conociendo la concentración adecuada, los macrófagos fueron sembrados en placas de 6 celdas a una densidad de 2X10⁶ células/celda. Las celdas se trataron con cicloheximida (5 μ M) o dimetil sulfoxido (DMSO) para el control (Sigma-Aldrich St. Louis MO, USA), seguidos de la activación con IFN- γ e incubados por 0 y 3 horas. El aislamiento de RNA total y la cuantificación del mensajero por medio de PCR cuantitativo en tiempo real, fue realizado de la manera anteriormente descrita.

5.1.4 Ensayo de transcripción iniciada (*nuclear run on transcription assay*).

Se usó este procedimiento para conocer con precisión si la regulación a la baja del gen *ABCA1* mediada por IFN- γ es un proceso transcripcional o post-transcripcional. Los macrófagos se cultivaron en frascos de 150 cm² con tapa ventilada a una densidad de 10⁶ células por frasco. Las células se incubaron con IFN- γ durante 3 y 6 horas. Terminada esta incubación, las células se enjuagaron dos veces y se suspendieron en PBS frío y se procedió al aislamiento del núcleo centrifugando la suspensión para obtener un botón a 1500 rpm (JOUAN GR 412, France) por 10 minutos a 4°C. El botón se resuspendió y centrifugó nuevamente bajo las mismas condiciones. Inmediatamente después el botón se resuspendió en 5 ml de amortiguador de lisis NP-40 (10 mM Tris Hcl pH 7.5, 10 mM Na Cl, 3mM MgCl₂, 1 %

NP 40), y se incubó en hielo durante 10 minutos para centrifugarse nuevamente a 1500 rpm por 10 minutos a 4°C. Se verificó por microscopía la integridad de los núcleos (sin rompimiento). Posteriormente se llevó a cabo la reacción de transcripción iniciada, incubando 5×10^7 núcleos en 300 μ l de 2X mezcla de transcripción conteniendo 180 mM KCl, 50 mM DTT, 20 mM Tris, 10 mM $MgCl_2$, 30 μ l de 10X nucleotide mix (10 mM dATP, 10 mM dCTP, 10 mM dGTP) y 500 μ Ci α 32 UTP a 37 °C por 10 minutos. Los núcleos se lisaron con 1.5 ml de 6M de cloruro de guanidina y se fragmentó el DNA pasando varias veces la muestra a través de una jeringa con aguja del número 19. A continuación se extrajo el RNA con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) seguido de centrifugación por 30 minutos a 12000 rpm (JA-21 rotor Beckman Coulter, Fullerton CA) a 4°C, y se precipitó con 5 ml de etanol frío centrifugando la muestra en las mismas condiciones. El botón se resuspendió en 300 μ l de solución DNAasa conteniendo 50 mM NaCl, 10 mM, $MgCl_2$, 10 mM Tris pH 7.5, 2 unidades/ml de DNAasa libre de RNAasas a 37 °C por 15 minutos. Se procedió nuevamente a la extracción y precipitación del RNA de la misma forma descrita anteriormente.

Se resuspendió el botón en 300 μ l de 10 mM tris y se le adicionó 1 ml de etanol frío para nuevamente precipitarlo con etanol por medio de centrifugación a 14000 rpm en una microfuga (Brinkmann Instruments Westbury, NY) a 4°C por 20 min. Se disolvió el botón en 250 μ l de 20 mM HEPES, pH 7.5 y se procedió con la hidrólisis alcalina de los transcritos adicionando a la muestra 63 μ l de 1M NaOH e incubando en hielo por 15 minutos. Terminada esta incubación se le agregó 125 μ l de 1M HEPES libre de ácido, 50 μ l de 3M NaOAc, y 1 ml de etanol seguido de centrifugación a 12000 rpm en

un rotor JA-21 a 4°C por 20 min. para precipitar el ácido nucleico. El botón fue resuspendido en 50 µl de ddH₂O para su posterior hibridización.

La preparación de los filtros se hizo inmediatamente antes de la hibridación usando la técnica de *slot blot*, la cual consiste en fijar el DNA a una membrana por medio de presión negativa usando para ello el aparato *slot blot manifold* (Schleicher and Shuell). Para ello se remojaron las membranas de nitrocelulosa (Hybond ECL Amershan Pharmacia Biotech, UK), previamente recortadas al tamaño del aparato, con 0.4 M de Tris, pH 7.0 por 30 minutos, y se colocaron entre las dos placas del aparato. Posteriormente 5 µg de DNA correspondiente a ABCA1, S29, β actina y GAPDH se colocaron en cada una de las ranuras, haciendo dos grupos: uno para el control y otro para el tratamiento con IFN-γ. Este DNA fue previamente suspendido en 40 µl de 10 mM Tris pH 7.0, posteriormente se le agregó 4 µl de 3M NaOH y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se le agregó a la muestra el mismo volumen de 2M acetato de amonio, pH 7.0 y se vertió en cada una de las ranuras del aparato. Se aplicó vacío al aparato hasta que el líquido desapareció de las ranuras y finalmente se enjuagaron con unas gotas de acetato de amonio al 1M. Se fijó el DNA a la membrana por medio de luz ultravioleta usando un *Stratalinke* (Stratagene, Emeryville, CA).

Previa a la hibridación, se le agregó a los RNA transcritos 100 µg/ml de fragmentos de DNA de esperma de salmón y se desnaturalizó calentando los ejemplares a 100°C por 2 minutos. Terminado lo anterior se agregaron a los frascos de hibridación que previamente contenían 2 ml de amortiguador de hibridación (1% SDS, 25 mM fosfato de sodio, pH 7.0, 5X SSC, 0.1% pirofosfato de sodio, formamida al 50% y 5X solución de Denhardt) y se incubaron a 42°C por 48 horas. Terminado el tiempo de

hibridización las membranas se lavaron 3 veces por 45 minutos a 65 °C con la solución de SDS al 1% SDS y 2X SSC. Al término de los lavados, la membrana fue envuelta en plástico y expuesta en una pantalla para fósforo (phosphoscreen Molecular Dynamycs, Inc. Sunnyvale, CA) y cuantificada por medio de un analizador de fósforo usando el programa Imagen Quant 5.2 (Molecular Dynamycs , Inc. Sunnyvale, CA) y el instrumento Storm 860 (Molecular Dynamycs , Inc. Sunnyvale, CA). La normalización fue realizada como la proporción del valor de la señal de ABCA1 contra el valor de la señal de S29, β actina y GAPDH.

Los cebadores para la identificación de los genes *ABCA1*, *S29*, β *actina* y *GAPDH* fueron diseñados con el programa VECTORNTI (NCBI) y sintetizados por Integrated DNA Technologies, Inc (IDT Coralville, IA) con las siguientes secuencias: ABCA1: F-

5'TGGCCAGTCTGTGTAACGGATCAA3',

R-5'GATGTCTTGGGCAGTCCAATCTA-3'

S29: F- GATGGGTCACCAGCAGCTCT-3'

R-5'CCATTCAAGGTCGCTTAGTC3'.

β -actin: F-5'ATGGGTCAGAAGGACTCCTA-3'

R-5'GTCTTGGCATAGAGGTCTTT-3'.

GAPDH: F-5'ACAAAATGGTGAAGGTCGGT-3'

R-5'TAGCCCAAGATGCCCTTCAG-3'.

Estos oligonucleótidos inicialmente se utilizaron en el estuche *First Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen life technologies CA) con la enzima Taq DNA polimerasa. Posterior a la amplificación se verificaron los fragmentos en un gel al 2% de agarosa, usando al mismo tiempo un marcador de peso molecular y también cuantificando cada uno de los fragmentos, usando para ello el marcador *High DNA*

Mass ladder (Invitrogen Life Technologies CA). Con la certeza del tamaño y la cantidad de cada uno de los fragmentos; éstos se purificaron usando el estuche QIAquick (Qiagen CA) y se mantuvieron a 20 °C hasta el momento de la hibridación.

5.2 Estudios basados en proteínas

5.2.1 Inmunotransferencia

Para los estudios de cinética de la proteína ABCA1, se cultivaron los macrófagos en placas de 6 celdas a una densidad de 5×10^6 células/celda.

La expresión de la proteína ABCA1 en macrófagos en estado basal es muy pequeña, de tal manera que este experimento se realizó en macrófagos y en macrófagos convertidos en células espumosas para poder identificar las bandas con mayor facilidad. Terminado el periodo de incubación para permitir la adhesión celular, las células se activaron con IFN- γ y se incubaron en los tiempos 0, 3, y 6 horas. Terminado cada una de las incubaciones las células se lavaron con PBS y se lisaron con amortiguador de urea-SDS (5 ml de 1M Tris pH 7.8, 2g SDS, 10 ml glicerol, 446 mg $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 36 g urea, y 2 ml 0.5 M EDTA). El DNA se fragmentó y las proteínas se solubilizaron por medio de sonicación por 15 segundos a una fuerza de 15%. Las proteínas se separaron por medio de un gel de tris acetato al 3 - 8%. Posterior a la electroforesis las proteínas fueron transferidas e inmovilizadas en una membrana de nitrocelulosa (Hybond ECL, Amersham Pharmacia Biotech, UK) por medio del sistema semiseco usando un *polyblot* (Polyblot ABN, Ca.). La membrana se bloqueó con leche

en polvo al 4.5% en PBS por una hora y al término se incubó durante la noche con anticuerpo de conejo purificado contra ABCA1 (1378Glu-1566Val) (35) y también con IgG policlonal de conejo *Anti-Heat Shock Protein 70* (HSP70) (UPSTATE Lake Placid, NY) como control de cantidad de proteína en cada línea. Las bandas inmunopositivas fueron visualizadas usando el anticuerpo secundario conjugado de peroxidasa anticabra y anticonejo (Sigma-Aldrich St. Louis MO, USA) seguido del aumento de intensidad de quimioluminiscencia usando como sustrato *Supersignal West Femton* (Pierce Chemical, Rockford, IL). Finalmente las membranas fueron expuestas a la película (Kodak Biomax- MS film) para detectar las bandas correspondientes a cada una de las proteínas.

5.2.2 Cinética de expresión de la proteína Stat1 y Stat1 fosforilada

Este experimento se realizó con los extractos nucleares y citosólicos de manera separada. Los macrófagos fueron cultivados en frascos de 75 cm² a una densidad de 10×10^6 . Los macrófagos fueron activados con IFN- γ por 0, 5, 10, 15 y 45 minutos. Posterior a la incubación se separaron los extractos nucleares y citosólicos siguiendo el método descrito por Waite K. et al, 2001 (137). Ya separados los extractos las proteínas se separaron en un gel de Bis-Tris al 4 -12% (NuPage) y se transfirieron siguiendo el mismo procedimiento anteriormente mencionado. Los anticuerpos usados fueron anti Stat1- HRPO, Anti-phospho-Stat1 (S727) (Upstate, cell signaling solution Lake Placid, NY) y ATF 3 (C-19) (Santa Cruz Biotechnology, Inc. CA). Este último como control de la cantidad de proteína en cada uno de los carriles.

5.2.3. Expresión de la proteína ABCA1 con diferentes bloqueadores de la proteólisis mediada por el sistema ubiquitina-proteosoma

Estos experimentos se realizaron en macrófagos convertidos en células espumosas. Las células se sembraron en placas de 6 celdas a una densidad de 5×10^6 células/celda. Se trataron las células con leupeptina a una concentración de 500 mg/ml, inhibidor 1 de calpaina (ALLN) a una concentración de 10 μ M y epoxomicina a una concentración de 1 μ M (Sigma-Aldrich St. Louis MO, USA) y se incubaron por 30 minutos, seguida de la activación con IFN- γ por 24 horas a una temperatura de 37°C. Terminado el tiempo de incubación, las células se lisaron y se procesaron con el mismo procedimiento y materiales descritos en la cinética de la proteína de ABCA1. Los anticuerpos utilizados fueron ABCA1, ERK, HSP70 y ubiquitina, los tres últimos adquiridos de UPSTATE (Lake Placid, NY).

5.2.4 Expresión de la proteína ABCA1 con diferentes bloqueadores de la proteólisis mediada por los lisosomas

Para realizar este experimento se siguió el mismo procedimiento y con el mismo material que en los experimentos anteriores. El gel utilizado fue Bis-Tris al 4-12% (NuPage) y los bloqueadores utilizados fueron NH₄CL en tres diferentes concentraciones: 10, 5 y 2.5 mM y cloroquina, también en tres concentraciones: 200, 100 y 50 μ M, ambos compuestos de Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA).

5.2.5 Análisis estadístico

En todos los experimentos se compararon las diferencias entre los tratamientos con IFN- γ y el vehículo particular para cada experimento.

La mayoría de los experimentos se analizó por medio de análisis de varianza (ANOVA) de una o dos vías. La significancia de la comparación emparejada de grupos fue determinada por los valores ajustados de p utilizando el ajuste de Bonferroni. La significancia fue definida como $p < 0.05$.

Para la evaluación de los niveles de RNAm en los tres primeros tiempos de incubación se utilizó un modelo ajustado de decaimiento exponencial usando el método de regresión lineal con un intervalo de confianza de 95%.

Los estudios con actinomicina D de la estabilidad de RNAm de ABCA1 se analizaron por medio de un modelo de decaimiento exponencial usando un método de regresión no lineal con un intervalo de confianza de 99.5% y una significancia de $p < 0.01$. La vida media del mensajero se calculó con el mismo método y parámetros y se calculó la vida media como el tiempo en el cual el mensaje fue reducido al 50%.

Para todos los análisis estadísticos se utilizó el programa JMP (SAS Institute, Cary NC).

6.0 RESULTADOS

El estudio de la cinética de expresión de *ABCA1* incubando macrófagos con IFN- γ a 0, 1, 3, 6, 24 y 48 h se muestra en la figura 3 (A). Los resultados mostraron una rápida disminución del RNA mensajero detectada una hora posterior a la activación. En este tiempo se observó una disminución alrededor del 30%, registrando a las 3 horas una caída en la expresión de cerca del 60% y alcanzando su máximo decaimiento a las 6 horas. La diferencia entre 3 y 6 horas no fue significativa, además de que este bajo nivel de expresión se mantuvo constante hasta el último tiempo de incubación. Todos los tiempos tuvieron diferencias significativas ($p < 0.05$) en la expresión cuando fueron comparados con la expresión del tiempo cero. El análisis de regresión lineal con los valores obtenidos en la cinética de los tiempos 0, 1, y 3 horas (figura 3-B) para el coeficiente de correlación (r^2) fue de 0.9878. Dada la importancia del rápido descenso del RNAm de *ABCA1*, se comprobaron los resultados obtenidos de los tres primeros tiempos de incubación con RT-PCR por medio de transferencia Northern de RNAm enriquecido con poli A (3-C). Una hora después de la adición de IFN- γ el descenso en la señal de expresión fue drásticamente reducido y muy difícil de detectar 3 horas después de la activación con IFN- γ . El histograma de los resultados de éste último experimento se presentan en la figura 3-D. Utilizando RNAr S29 (S29) como control interno, los valores presentados son el resultado de la proporción de la señal emitida por *ABCA1* contra la señal emitida por S29.

Para tener certeza de que la regulación a la baja del gen *ABCA1* es un proceso transcripcional o post-transcripcional, se realizó un ensayo de transcripción iniciada donde el objetivo fue permitir que la transcripción se iniciara en los cultivos de

macrófagos activados por 6 horas con IFN- γ . Después de la incubación, los núcleos de los macrófagos se aislaron y se permitió continuar con la transcripción en un medio óptimo y con los componentes necesarios, además del nucleótido UTP marcado con fósforo radioactivo para su posterior cuantificación. Como se muestra en la figura 4-A, no hubo diferencia en la intensidad de hibridación de la sonda de ABCA1 control o ABCA1 tratado con IFN- γ , así como tampoco se presentan diferencias en intensidad de hibridación de las sondas de β -actina y S29; éstos dos últimos fueron utilizados como control interno para la posterior normalización. Esta normalización se realizó como la proporción de la intensidad de señal ABCA1 contra la intensidad de señal de β -Actina o S29. La gráfica de los resultados obtenidos después de la normalización en los diferentes experimentos realizados con los dos controles anteriores, adicionando los resultados obtenidos también con GAPDH como un tercer control interno, se muestra en la figura 4-B, no siendo significativa ninguna de las diferencias entre tratamientos. El resultado de estos experimentos sugiere que la regulación a la baja de ABCA1 por IFN- γ no es un proceso transcripcional.

La síntesis de proteínas *de novo* tiene una participación importante en algunos procesos de reducción del mensajero. Para determinar esta participación se incubaron macrófagos con vehículo, IFN- γ , cicloheximida y la combinación de cicloheximida más IFN- γ durante 3 horas; posterior a la incubación se cuantificó la expresión de ABCA1 con la técnica de RT-PCR, usando como control interno 18S.

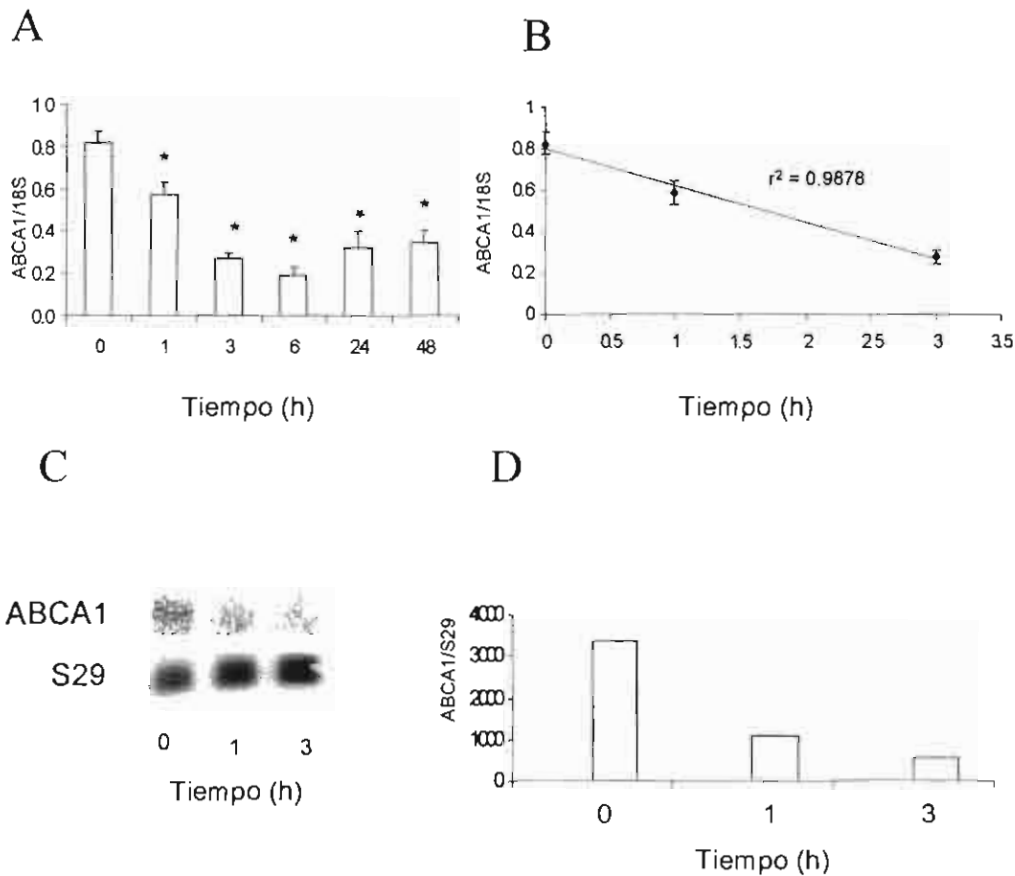


Figura 3. Cinética de la regulación a la baja de la expresión de *ABCA1* mediada por $IFN-\gamma$ (A) Macrófagos peritoneales de ratón tratados con 10ng/ml de $IFN-\gamma$ por 0, 1, 3, 6, 24 y 48 horas. Al término de cada una de las incubaciones las células fueron lisadas, RNA aislado y RNAm de *ABCA1* fue cuantificado por medio de RT-PCR. El RNA 18S fue utilizado como control interno y normalización. Las barras indican el SEM, n=3. La significancia fue calculada por medio de la prueba de ANOVA de dos vías. El valor de P fue calculado por medio de ajuste de Bonferroni. *significancia $p < 0.05$ relativa al tiempo 0. (B) Análisis de regresión lineal de la disminución del RNAm de *ABCA1* de los tiempos 0, 1, 3 horas de incubación con $IFN-\gamma$. $r^2=0.9878$. (C) Macrófagos lisados después de 0, 1, y 3 horas de incubación con $IFN-\gamma$ y con su RNAm enriquecido con poli A y fueron realizadas transferencias Northern hibridando con las sondas para identificar *ABCA1* y S29. Se muestra el resultado de tres distintos experimentos. (D). Cuantificación de las bandas marcadas radioactivamente por medio de un analizador de fósforo y el programa *Imagen Quant 5.2* La expresión fue ajustada por la diferencia entre la cantidad de muestra de cada uno de los tratamientos usando para ello S29 como control interno.

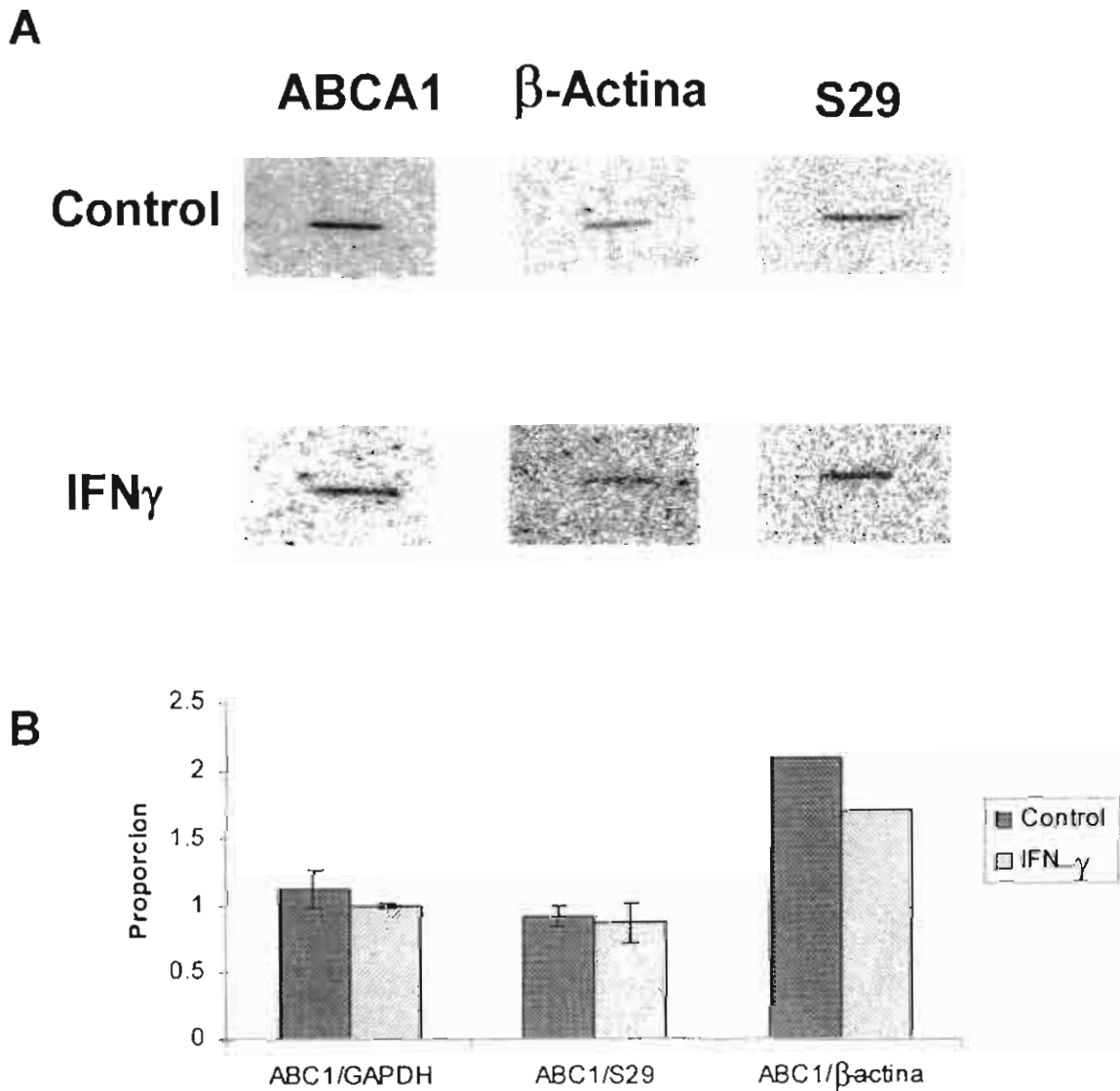


Fig 4. La disminución de *ABCA1* no es regulada transcripcionalmente. Los macrófagos fueron lisados después de 6 horas de estimulación con vehículo (control) o IFN- γ ; se realizó un ensayo de transcripción iniciada y cantidades comparables de RNA marcado con P^{32} hibridado en filtros de nitrocelulosa conteniendo 5 μ g de cDNA de ABC1, GAPDH, β -actina y S29. (A) Transferencia representativa de tres experimentos independientes. (B) La intensidad de señal de las bandas fueron cuantificadas y expresadas como la proporción de GAPDH, β -actina o S29. Las bandas representan el error estándar de la media (SEM) de 2 o 3 repeticiones.

En la figura 5 se muestran los resultados de estos experimentos, donde se puede apreciar que la regulación a la baja de *ABCA1* mediada por IFN- γ se inhibió cuando los macrófagos se incubaron con cicloheximida, mientras la expresión del mensajero se redujo alrededor de 40% en los macrófagos activados con IFN- γ , mientras que en aquellos incubados con ambos, IFN- γ y cicloheximida, se identificó un aumento en la expresión del RNAm de *ABCA1*, lo que sugiere la participación de síntesis de proteínas *de novo* en el proceso de regulación a la baja de *ABCA1* mediada por IFN- γ . En la misma gráfica se puede observar también que el tratamiento con cicloheximida resultó en una elevación de la expresión del RNAm del gen en estudio, pudiéndose explicar por la existencia de síntesis de proteínas que tiene un efecto negativo en la expresión de *ABCA1* y que además son independientes a la actividad de IFN- γ . En este experimento se tuvo una diferencia significativa ($p < 0.05$) en todos los tratamientos cuando se compararon con el control (DMSO).

La habilidad de la cicloheximida de inhibir la regulación a la baja de *ABCA1* nos hizo pensar que IFN- γ podía incrementar el índice de degradación del RNAm de *ABCA1*, reduciendo de esta manera su estabilidad. Para contestar esta incógnita se llevaron a cabo experimentos con un inhibidor de la síntesis de RNA (actinomicina D), por lo que se incubaron macrófagos peritoneales de ratón únicamente con actinomicina D (5 ug/ml), o en combinación con IFN- γ , en diferentes intervalos de tiempo que fueron entre 0 y 8 horas. Al término de cada incubación las células se lisaron y se cuantificó el RNAm de *ABCA1* y 18S por medio de la técnica de Taqman. En la figura 6 se muestran los resultados de estos experimentos en donde se puede apreciar que las células con ambos tratamientos, actinomicina D o actinomicina D combinada con IFN- γ , presentaron un descenso exponencial del RNAm de *ABCA1*. Cuando se

compararon los dos tratamientos entre sí se encontró que IFN- γ incrementa el nivel exponencial de degradación observándose una vida media ($t_{1/2}$) de 115 minutos en las células tratadas sólo con actinomicina D, contra 37 minutos en la presencia de IFN- γ . Esta diferencia en la vida media con ambos tratamientos se observó a los 30 y 60 minutos, no presentando ya ninguna diferencia entre tratamientos a partir de los 90 minutos. Estos resultados sugieren un mecanismo pos-transcripcional que involucra la desestabilización del mensajero en la regulación a la baja de RNAm de ABCA1 mediada por IFN- γ .

Se ha demostrado que la expresión de la proteína ABCA1 también se ve disminuida como respuesta a la activación de macrófagos con IFN- γ cuando los macrófagos se incuban durante 48 horas (87). En el presente trabajo se realizaron estudios similares, pero en intervalos de tiempo cortos para determinar si la proteína tenía un comportamiento similar a la disminución de la expresión observada en el RNAm de ABCA1. Este experimento se realizó en macrófagos y en macrófagos convertidos en células espumosas, ambos activados con IFN- γ .

Los tiempos utilizados fueron 0, 3 y 6 horas. Terminada cada incubación las células se lisaron y las proteínas se separaron para posteriormente realizar una transferencia Western. En ambas células se observó una disminución en la expresión de la proteína a las 3 horas, siendo más pronunciada la disminución a las 6 horas. Para tener la certeza de que esta disminución sólo ocurre en la expresión de la proteína ABCA1, se probó la misma membrana con anti HSP70, que se usó como control interno y el cual no presentó ningún cambio (figura 7).

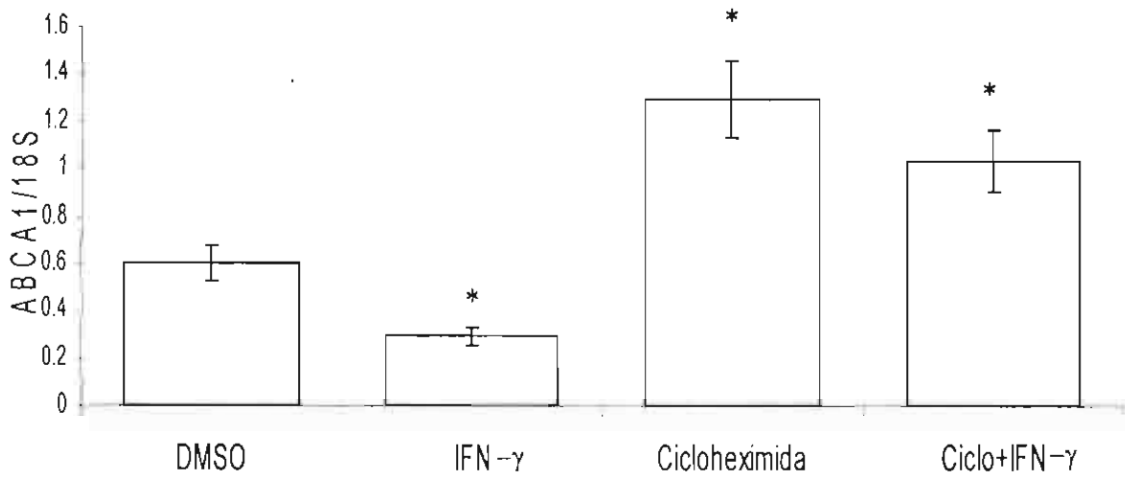


Figura 5. La reducción de RNAm de *ABCA1* es dependiente de síntesis proteica *de novo*. Los macrófagos fueron estimulados con IFN- γ durante 3 horas en presencia o ausencia de 5 μ M de cicloheximida. Las células fueron lisadas y el RNAm se cuantificó por medio de RT-PCR normalizado con RNAm de 18S. Las barras indican el SEM de 3 experimentos por separado. * indica significancia $p < 0.05$ relativa a DMSO (control), que fue calculada por medio del ajuste de Bonferroni determinado por el análisis de ANOVA de dos vías.

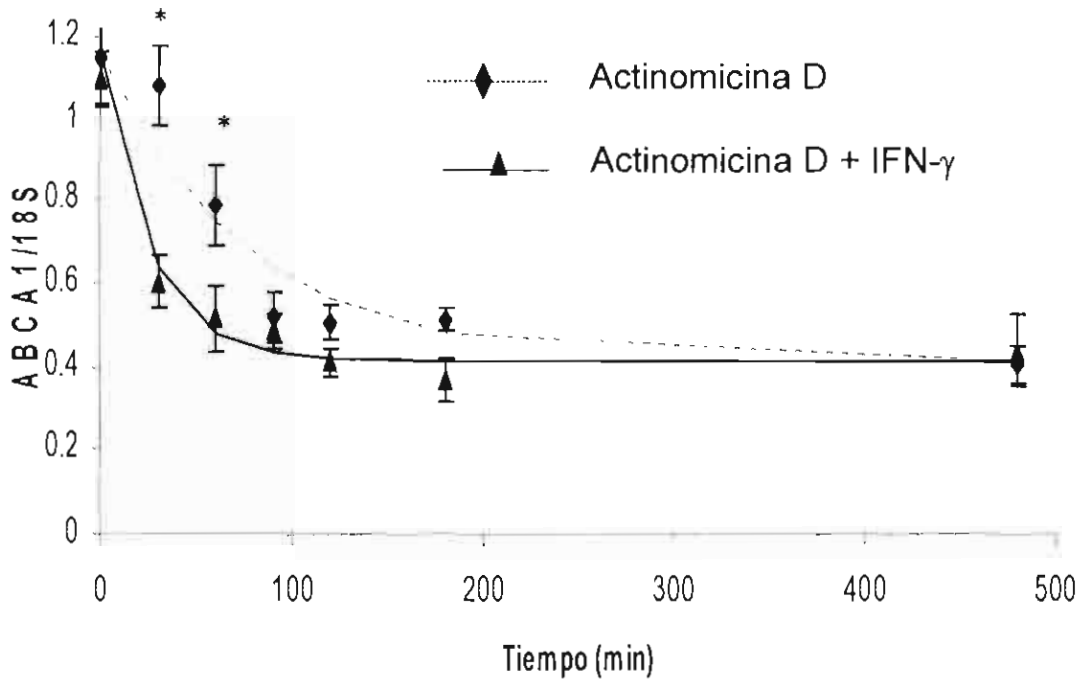


Figura 6. El IFN- γ incrementa el índice de degradación de RNAm de *ABCA1*. Los macrófagos fueron incubados con 5 $\mu\text{g/ml}$ de actinomicina D anterior a la adición de IFN- γ o vehículo. Las células fueron lisadas a los tiempos de 0 a 480 minutos y el RNAm cuantificado por medio de RT-PCR y normalizado con la expresión de RNAm de 18S. La cinética de degradación de RNAm de *ABCA1* fue un modelo de decaimiento exponencial.

* Diferencia en el índice de degradación entre las células tratadas con vehículo y las células tratadas con IFN- γ .

Es claro entonces que así como se observa una disminución del RNAm de *ABCA1* como respuesta a la activación de los macrófagos con IFN- γ , también se observa una disminución en la expresión de la proteína en tiempos similares.

El resultado obtenido en la cinética del RNAm de *ABCA1* y su correspondiente disminución de la proteína, así como la dependencia de esta regulación a la baja de la ruta de señalización Stat, requiere de otros estudios en macrófagos activados con IFN- γ que permitan evaluar el comportamiento de Stat1, particularmente la cinética de fosforilación y su subsiguiente translocación hacia el núcleo. Como las circunstancias lo requirieron, se realizó un experimento incubando macrófagos con IFN- γ en intervalos que comprendieron entre 0 y 45 minutos, posteriormente las células se lisaron y se separaron en extractos nucleares y citoplásmicos. Las proteínas de cada una de estas fracciones se separaron por medio de electroforesis para posteriormente fijarlas por medio de una transferencia Western. Las membranas fueron retadas contra los anticuerpos Stat1, Stat1 fosforilado (P-Stat1) y contra el factor de transferencia ATF3 como control de cantidad de proteína en cada carril y también como control interno. Como se muestra en la figura 8, la adición de IFN- γ resultó en una rápida fosforilación y translocación de Stat1 hacia el núcleo, el cual fue detectado en los dos compartimentos a los 10 minutos después de esta activación; no fueron observados incrementos posteriores a los 15 y 45 minutos. También se observó que la translocación máxima de P-Stat1 del citoplasma hacia el núcleo ocurrió a los 10 minutos después de la activación con IFN- γ . Para asegurarnos que esta fosforilación y translocación hacia el núcleo de Stat1 es un evento particular de este factor de transcripción, la membrana se probó bajo las mismas condiciones con otro factor de transcripción llamado ATF3, el cual no presentó cambio alguno en presencia de IFN- γ .

Por lo tanto, la rápida degradación tanto del RNAm como de la proteína de ABCA1 en macrófagos activados con IFN- γ , fue consistente con la rápida fosforilación y translocación de P-Stat1 hacia el núcleo.

La rápida reducción que mostró la proteína ABCA1 es un indicador de su degradación temprana mediada de alguna manera por IFN- γ . Este pensamiento nos condujo a la creación del siguiente experimento donde se pretendió comprobar la participación de la ruta de degradación proteica dependiente de ubiquitina (proteosoma). Para alcanzar este objetivo, macrófagos convertidos en células espumosas se incubaron durante 6 horas con IFN- γ , un inhibidor de la degradación de proteosoma, leupeptina (500ug/ml), y la combinación de ambos, con su correspondiente control. Al final de este periodo de tiempo, las células se lisaron y se separaron en un gel, el cual posteriormente se inmovilizó en una membrana de nitrocelulosa por medio de una transferencia Western. La membrana fue probada con los anticuerpos anti-ABCA1, y anti ERK, como control de cantidad de muestra en cada carril y anti-ubiquitina, para comprobar que se realizó la ubiquitinación que precede a la degradación proteosomal. Como se puede observar en la figura 9-A, el resultado de este experimento mostró que la combinación de leupeptina con IFN- γ no inhibió la degradación de la proteína ABCA1 cuando se comparó esta intensidad de banda con la observada en las células tratadas solo con IFN- γ . También, se puede apreciar en esta figura que efectivamente se está bloqueando la degradación proteosomal mediada por IFN- γ , por la acumulación de ubiquitina en las células tratadas con ambos agentes.

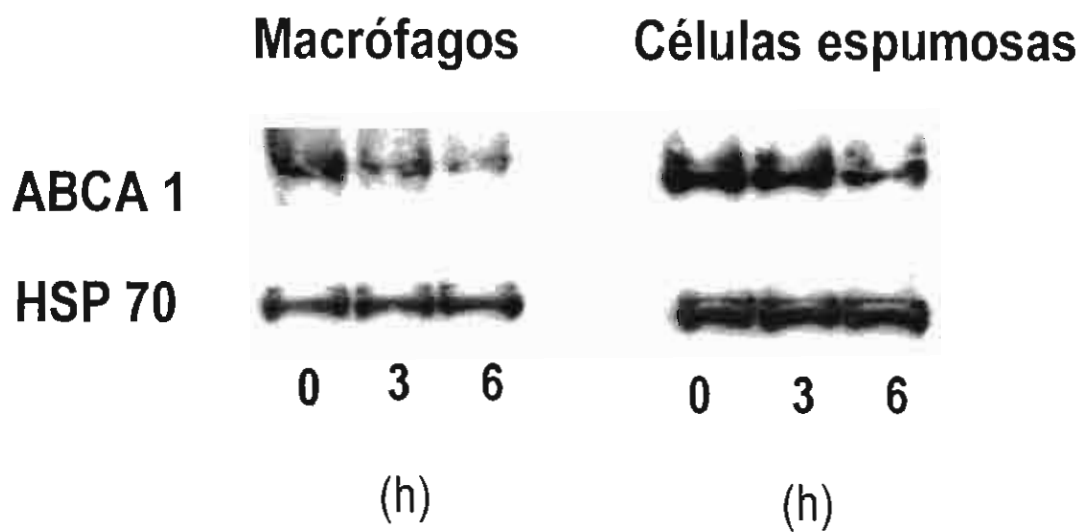


Figura 7. Disminución de la proteína ABCA1 en macrófagos activados y en células espumosas activadas con IFN- γ . Los macrófagos y los macrófagos convertidos en células espumosas fueron incubados con 10 ng/ml de IFN- γ a los tiempos 0, 3 y 6 horas, las células se lisaron, y las proteínas se separaron por medio de electroforesis y se fijaron en un filtro de nitrocelulosa. Las membranas fueron desafiadas con antisuero policlonal contra ABCA1 y HSP70 como control interno. Se presenta una transferencia representativa de 3 experimentos separados.

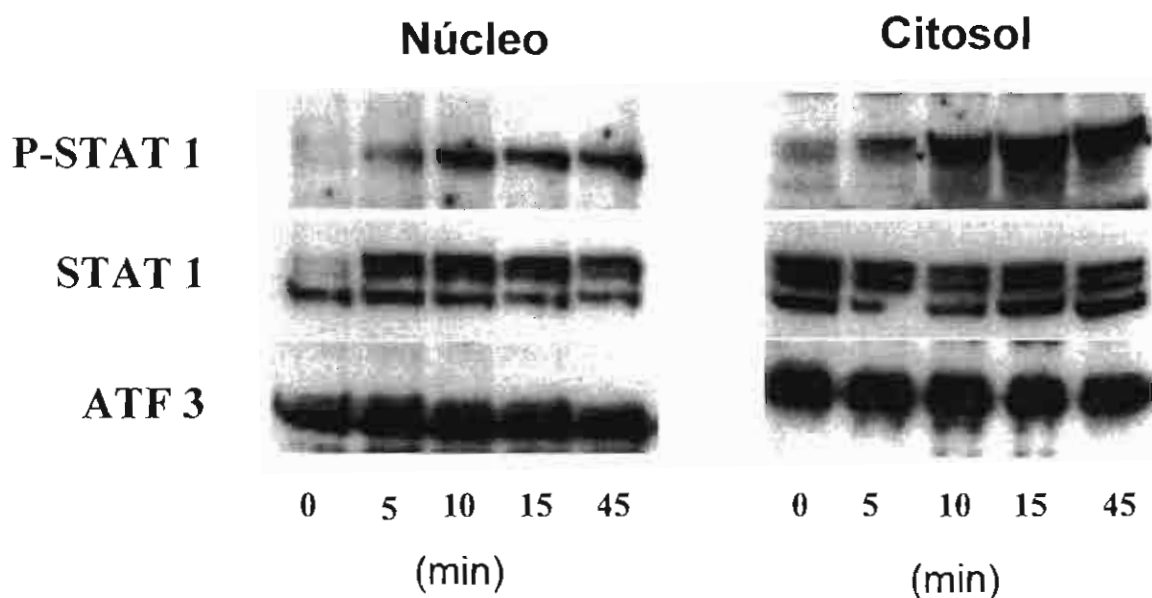


Figura 8. IFN- γ induce la fosforilación y translocación hacia el núcleo de Stat1. Macrófagos incubados con IFN- γ en intervalos de tiempo de 0 a 45 minutos. Al término de cada una de las incubaciones las células se lisaron y separaron en fracciones nucleares y citosólicas, estas fracciones fueron separadas por medio de un gel SDS y trasferidas en una membrana de nitrocelulosa donde se desafiaron con anticuerpos policlonales contra Stat1, P-Stat1 y ATF3. Las bandas inmunopositivas fueron detectadas con anticuerpo secundario conjugado de peroxidasa anticabra-anticonejo. Se presenta una transferencia representativa de 3 experimentos independientes.

Siguiendo con el mismo objetivo se realizaron experimentos similares, pero ahora con dos inhibidores potentes de la degradación dependiente de ubiquitina-proteosoma; epoxomicina ($0.01\mu\text{M}$) y calpaina proteasa 1 (ALLN, $10\mu\text{M}$); este último componente también inhibe la degradación mediada por la proteasa calpaina, que es una de las rutas de degradación normal de la proteína ABCA1.

La ruta de degradación proteica ubiquitina-proteosoma no es la ruta que se activa cuando las células son incubadas con IFN- γ . Como se muestra en las figuras 9-B y 9-C, ninguno de estos inhibidores logró bloquear la rápida degradación proteica que es mediada por IFN- γ , no obstante que la ubiquitinación de las proteínas se observó por medio del aumento en la intensidad de las bandas correspondientes a las células tratadas con estos compuestos. Así mismo el resultado en la figura 9-C muestra que la ruta de degradación mediada por la secuencia PEST, la cual es reconocida y degradada por medio de la proteasa calpaina, tampoco es la ruta que media la rápida degradación de la proteína activada por IFN- γ .

Con el conocimiento de que IFN- γ no desencadena la ruta de degradación de proteínas ubiquitina-proteosoma en el mecanismo de la rápida degradación de la proteína en estudio, se planteó un nuevo experimento para conocer si la ruta de degradación proteica dependiente de los lisosomas, es la ruta responsable de la disminución de esta proteína. Para ello, se efectuó un experimento usando dos bloqueadores de esta ruta, ambos con actividad en diferentes fases de este proceso. Se incubaron macrófagos convertidos en células espumosas con cloroquina (200, 100 y $50\mu\text{M}$) y cloruro de amonio (10, 5 y 2.5mM) (figura 10) en presencia o ausencia de IFN- γ , el resto del experimento se realizó bajo las mismas condiciones que los experimentos anteriores. En ambos casos el resultado fue similar: cuando se comparó

la intensidad de las bandas de las células coincubadas con IFN- γ , más cada uno de los bloqueadores de la degradación lisosomal contra la intensidad de las bandas obtenidas en las células tratadas sólo con IFN- γ , la señal de las bandas se mantuvo disminuida, indicando que la rápida degradación de las proteínas que IFN- γ desencadena no es tampoco la vía de la degradación lisosomal, dado que ninguna de las concentraciones usadas logró alcanzar una intensidad similar a la obtenida en las células control.

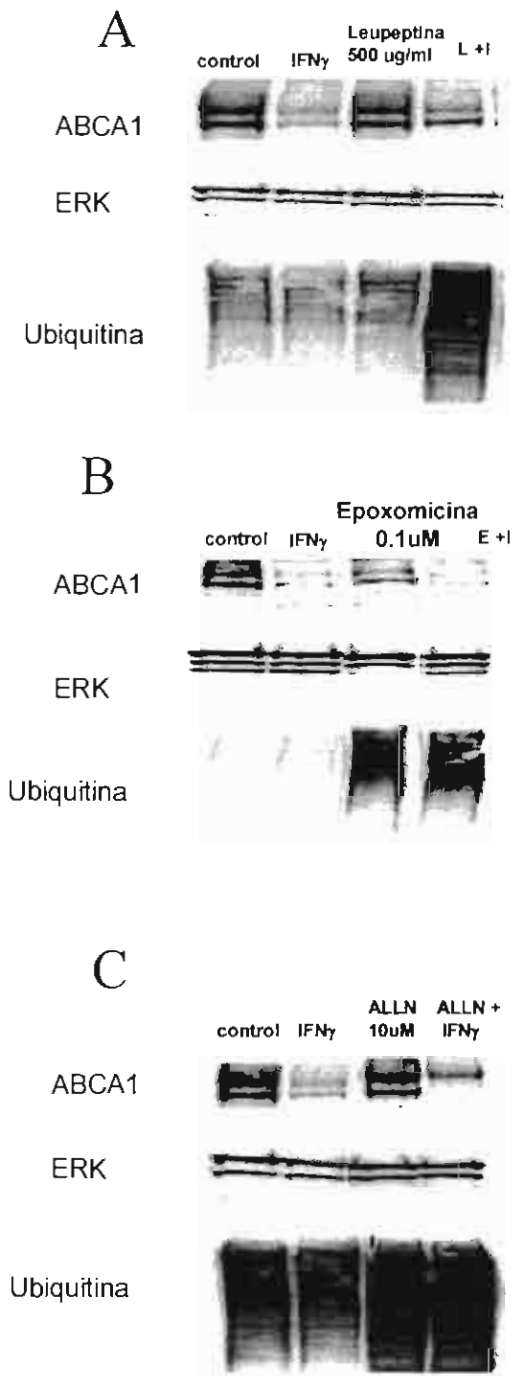


Figura 9. La ruta de degradación ubiquitina-proteosoma no participa en la rápida degradación de la proteína de ABCA1 inducida por IFN- γ . Macrófagos convertidos en células espumosas fueron incubados durante 6 horas con diferentes inhibidores del proteosoma con o sin IFN- γ , además de su correspondiente control. Al término de la incubación, las células fueron lisadas y las proteínas separadas e inmobilizadas en una membrana de nitrocelulosa por medio de una transferencia Western, donde se desafiaron con el suero policlonal contra ABCA1, ubiquitina y ERK (A) Resultado obtenido con el bloqueador de proteosoma leupeptina (500 μ g/ml), (B) epoxomicina (0.01 μ M), y (C) ALLN (10 μ M). Se presenta una transferencia representativa de 3 experimentos distintos para cada uno de los inhibidores.

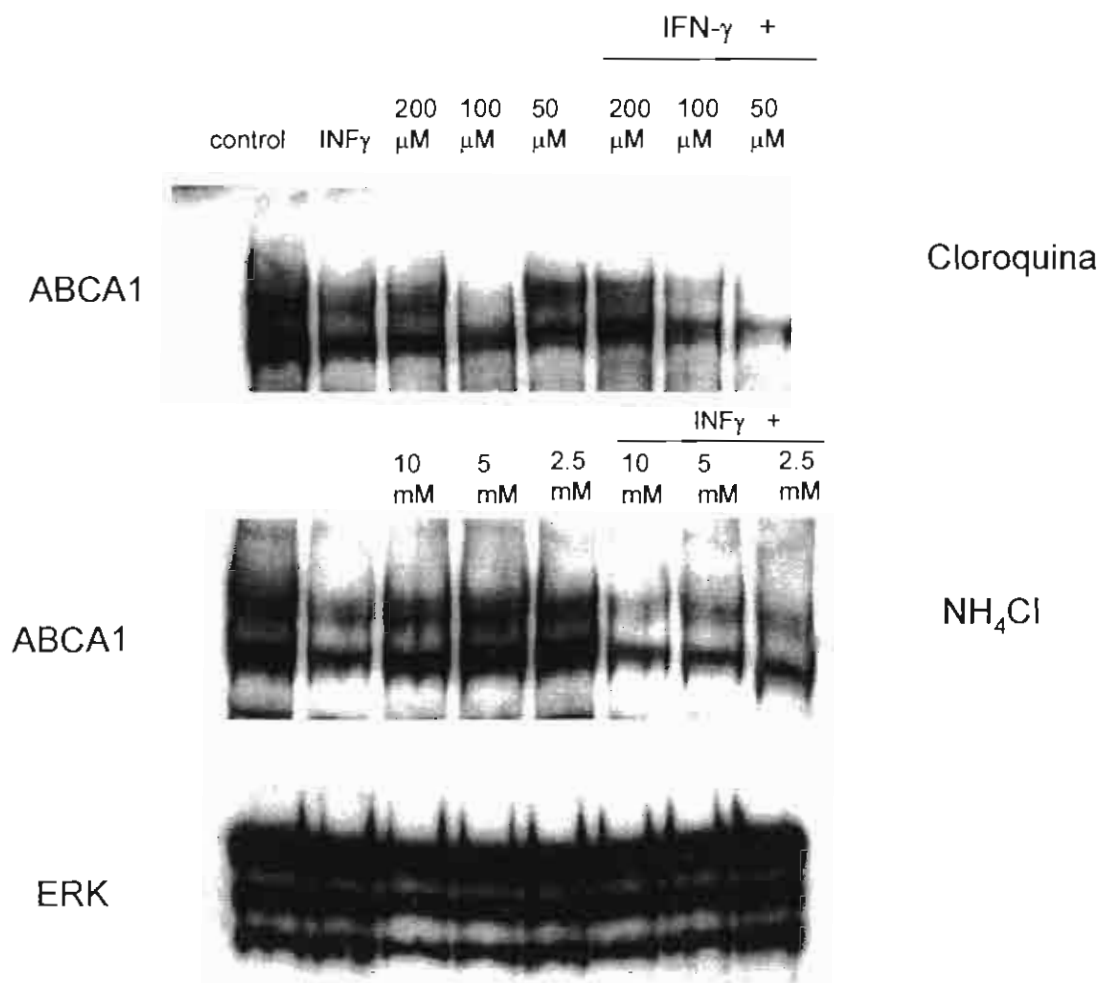


Fig 10. La ruta de degradación lisosomal no participa en la rápida degradación de la proteína de ABCA1 desencadenada por IFN-γ. Macrófagos convertidos en células espumosas fueron incubados durante 6 horas con vehículo, IFN-γ, cloroquina o NH₄Cl y la coincubación de cada uno de ellos con IFN-γ. Al término de la incubación, las células fueron lisadas y las proteínas separadas e inmovilizadas en una membrana de nitrocelulosa por medio de una transferencia Western, donde se desafiaron con el suero policlonal contra ABCA1 y ERK como control de cantidad de proteína de muestra utilizada en cada uno de los carriles.

7.0 DISCUSION

La aterosclerosis es considerada como una respuesta inflamatoria crónica, que se inicia como respuesta a la acumulación de lipoproteínas modificadas en la arteria. Las células inflamatorias en esta área sintetizan una gran variedad de moléculas, entre las que se encuentran las citocinas; que están presentes en todos los estados del desarrollo de la lesión aterosclerótica. Una de las citocinas que está presente en infiltrados de la lesión aterosclerótica es el IFN- γ , el cual ha emergido como un factor clave en la patogénesis de esta enfermedad (138), ya que su presencia altera el patrón de expresión genética en las células localizadas en el área, pudiendo ser este cambio un aumento, disminución o completa anulación de su expresión durante el proceso aterosclerótico. De esta manera IFN- γ regula genes que afectan negativamente procesos celulares asociados al transporte reverso de colesterol, mecanismo importante en la eliminación del exceso de colesterol. Entre los cambios provocados por esta citocina, se pueden mencionar el aumento en la expresión de ACAT que IFN- γ promueve en macrófagos de ratón, lo que conlleva a una acumulación de ésteres de colesterol en el citoplasma celular, formando así las células espumosas. En contraste, al aumento de la expresión de ACAT; IFN- γ , disminuye la expresión de colesterol 27 hidroxilasa, enzima que cataliza la hidroxilación del colesterol libre, forma en la que puede ser removido eficientemente por la albúmina, además de las HDL. También se ha reportado la disminución de lipoproteína lipasa y apoproteína E, cuya función es la hidrólisis de los triglicéridos y la limpieza del colesterol del área hacia su transporte al hígado. Se ha observado también la reducción en la expresión de los receptores de recolección SR-A y CD36,

que se unen a LDL oxidados o eterificados (81,82, 139) . En macrófagos, IFN- γ ha demostrado regular a la baja otros receptores de lipoproteínas incluyendo en este grupo a la proteína relacionada con el receptor LDL (LRP) y con el receptor de VLDL (140-141); ambos poseen un dominio de reconocimiento a apoE, cuya unión promueve la remoción de lipoproteínas remanentes y triglicéridos, con su posterior transporte hacia el hígado. Asimismo, IFN- γ reduce la internalización y degradación del receptor de la lipoproteína aterogénica conocida como lipoproteína (a) (Lp(a)) y su correspondiente dominio proteico (r-Lp(a)/apo(a)), participando ambos en la remoción local de lipoproteínas remanentes en los tejidos (86). En estudios previos se ha reportado que IFN- γ reduce la salida de colesterol de las células espumosas, al menos en parte por su acción inhibitoria en la expresión de ABCA1 (87). Este transportador es de suma importancia en la disminución de la lesión aterosclerótica, ya que promueve la salida de colesterol en las células espumosas. En experimentos realizados con macrófagos peritoneales procedentes de ratones *knockout* (KO) para la expresión de Stat1, se observó que la regulación a la baja de ABCA1 fue dependiente de la ruta de señalización mediada por Stat1, debido a la incapacidad que IFN- γ presentó para disminuir la expresión de ABCA1 en estas células, disminución que se observó en macrófagos de los ratones control (136). Estos cambios fueron evidentes en macrófagos incubados con IFN- γ por un periodo de 48 horas. En el presente estudio se investigaron las cinéticas de expresión del gen ABCA1 así como el mecanismo de esta regulación, para en un futuro poder incidir en él y modificarlo con el fin de eliminar los riesgos que la enfermedad aterosclerótica desencadena. En los resultados obtenidos en la cinética de expresión del RNAm de ABCA1, se detectó una reducción significativa a una hora posterior a la activación con

IFN- γ , lo cual nos indica que este gen presenta una respuesta temprana a IFN- γ . Esta rápida disminución, fue asociada con síntesis de proteína *de novo*, así como con una regulación post-transcripcional, la cual involucra desestabilización del RNA mensajero.

También se ha reportado que IFN- γ regula a la baja otros receptores de membrana que no están directamente relacionados en el tránsito de lipoproteínas, pero que sí lo están con el proceso inflamatorio. Tal es el caso del receptor de la proteína quimotáctica CCR2 en monocitos/macrófagos tratados con IFN- γ , donde se mostró una vida media corta de su UNAM, cuando se comparó con la vida media de las células control; sin embargo, se detectó que el índice del RNAm transcrito no se afectó. Otro receptor de la misma familia, CXCR4, mostró el mismo comportamiento como respuesta a la activación con IFN- γ en monocitos y células endoteliales. La cinética que se ha observado en estudios previos es similar a la cinética observada en este estudio de ABCA1, ambos presentaron una disminución significativa del mensajero a las 3 horas posteriores de incubación con IFN- γ ; de la misma forma, la regulación a la baja de estos dos receptores fue por medio de un mecanismo post-transcripcional. Estos receptores para las quimocinas CCR2 y CXCR4 representan un ejemplo de genes regulados a la baja rápidamente por IFN- γ , en los cuales los elementos repetidos de adenina y uracilo (ARE), que están ubicados en la región no codificadora del extremo 3' del RNAm son motivos blanco para la degradación (142-143).

Cinéticas similares de regulación a la baja se han demostrado en la expresión del proto-oncogen *c-fos* (144), y también en la expresión del gen de la quimocina *KC/GRO* (145). La regulación a la baja de *c-fos* en macrófagos peritoneales de ratón

fue detectada una hora posterior a la activación con IFN- γ y los experimentos realizados en este estudio con actinomicina D demostraron un rápido coeficiente de degradación. Sin embargo, en el RNAm de *c-fos* se encuentran secuencias desestabilizadoras ARE, las cuales como se mencionó no se encuentran en el RNAm de *ABCA1* (144). La regulación a la baja de *ABCA1* no está limitada a IFN- γ . Esto se demostró cuando la línea celular de macrófagos murinos RAW264 se estimuló con lipopolisacárido (LPS) y presentó una marcada reducción en la expresión de *ABCA1* observada a las 6 horas de incubación, desapareciendo totalmente a las 24 horas. A la fecha, no se ha dilucidado si esta regulación a la baja de *ABCA1* es debida a la degradación del mensajero o no (135). La reducción de la expresión de *ABCA1*, se ha observado también con estímulos no asociados directamente con la respuesta inflamatoria. Por ejemplo, cuando la línea celular de leucemia monocítica humana (THP-1) fue incubada con el metabolito mevalonato pirofosfato de geranilgeranil (GGPP), se observó una reducción de RNAm de *ABCA1* del 40% a las 3.5 horas, detectándose a las 16 horas la reducción máxima. Esta reducción parece ocurrir mediante un antagonismo directo a LXR que GGPP promueve, dado que los niveles de LXR no sufrieron ningún cambio (146).

Los ácidos grasos insaturados, los acetatos y las cetonas han demostrado también tener un efecto reductor en la expresión tanto del mensajero como de la proteína de *ABCA1* en las líneas celulares HepG2 y RAW264. En este estudio se transformaron células con el gen reportero luciferasa, construido con 968 bases del promotor humano de *ABCA1* y se estimularon con 22-hidroxicolesterol y ácido 9-cis retinoico. La actividad de la luciferasa fue reducida en un 50 y 80 % en las células activadas por

ácido linoleico y acetoacetato, respectivamente, quedando pendiente la determinación del mecanismo (147).

En células HepG2 y RAW264.7 con inducción de la expresión de *ABCA1* por medio de 20 (S) colesterol y 9-cis ácido retinoico, se reportó regulación a la baja de *ABCA1*, debido a la unión del factor de transcripción ZNF202m al promotor, reprimiendo de esta manera su actividad. (148).

Finalmente, también se ha reportado regulación a la baja de *ABCA1* en macrófagos peritoneales murinos, en las líneas celulares RAW264.7 y THP-1, así como en macrófagos primarios humanos *in Vitro* tratados con inhibidores de la enzima clave en el metabolismo del colesterol, HMG-CoA reductasa. En este estudio, el RNAm de *ABCA1* fue reducido en 3 horas e inhibido a las 12 horas posteriores a la incubación con fluvastatina, presentando un efecto reversible cuando las células se incubaron con L-mevalonato exógeno (149). La magnitud de la reducción del mensajero de *ABCA1* fue mayor que la esperada dada la modesta reducción en la actividad del promotor de *ABCA1*. Estudios adicionales sugirieron que parte del efecto de las estatinas sobre *ABCA1*, fue la inhibición de la síntesis del ligando de los oxisteroles 24 (s0S), 25-epoxicolesterol comprometiendo por lo tanto la estimulación mediada por LXR para la transcripción de *ABCA1* (150). Como se puede ver, existen diversos mecanismos de regulación a la baja de *ABCA1*, provocados también por distintas moléculas, que en parte coinciden con nuestro modelo en los tiempos, o, que es un proceso post-transcripcional, pero no en su totalidad, por lo que hace suponer en un mecanismo específico y delicado que mediador de este proceso.

Abordando ahora los resultados obtenidos en la síntesis proteica, éstos mostraron una disminución de la proteína a las 3 horas posteriores a la incubación con IFN- γ . El

mecanismo por medio del cual IFN- γ conduce a la proteína ABCA1 a una rápida degradación permanece desconocido. Los ensayos realizados en este estudio usando los inhibidores de proteosoma, epoxomicina, ALLN y leupeptina, no lograron inhibir esta rápida degradación inducida por IFN- γ , no obstante el significativo aumento en la ubiquitinación de la proteína total observada en las transferencias Western. También se tuvo el mismo resultado negativo en los experimentos realizados con dos diferentes inhibidores de la degradación lisosomal, específicamente NH_4Cl y cloroquina. Contrario a estos resultados, se ha reportado una disfunción de la ruta de salida de colesterol de células espumosas mediada por ABCA1 en células incubadas con colesterol libre; esta disfunción fue ocasionada por la inducción de degradación de esta proteína (151). De la misma forma, cuando los macrófagos convertidos en células espumosas se incuban con ácidos grasos insaturados se suprime la excreción celular de colesterol realizada a través de ABCA1, debido a su rápida degradación (152). En ambos estudios no se sabe la naturaleza de esta degradación.

En este estudio, la incapacidad que resultó de inhibir la disminución de la proteína de ABCA1 por medio de tres bloqueadores que actúan en tres diferentes sitios catalíticos de la degradación proteosomal, así como de dos diferentes inhibidores lisosomales, sugiere que la degradación de ABCA1 mediada por IFN- γ se lleva a cabo por medio de una ruta independiente a las grandes rutas degradativas proteicas.

Estudios realizados en el laboratorio del Dr. A. Tall (153), en macrófagos primarios murinos y hepatocitos, demostraron que la degradación normal de la proteína de ABCA1 es regulada por dos mecanismos, uno de ellos es por medio de la ubiquitinación y degradación proteosomal y la segunda es regulada por medio de una secuencia conservada PEST (prolina, glutamina, serina y treonina), la cual es

reconocida, fosforilada y degradada por la proteasa tiol conocida como calpaina. De acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación con ALLN, el cual además de ser un potente inhibidor de la degradación proteosomal, también tiene la capacidad de neutralizar la actividad de la proteasa calpaina, podemos sugerir que esta vía de degradación tampoco está presente en el proceso desencadenado por IFN- γ .

Es evidente que la regulación a la baja de *ABCA1* depende de la naturaleza del estímulo, pudiendo éste ser de naturaleza inflamatoria o no inflamatoria. Estos estímulos provocan una disminución en la expresión del mensajero pudiendo deberse esta reducción a modificaciones transcripcionales o post-transcripcionales. Los resultados de nuestro estudio evidencian la importancia de los procesos post-transcripcionales que median este mecanismo, donde se sugiere la participación de factores desestabilizadores de RNAm, activados por IFN- γ . A la fecha existen numerosas proteínas, cuya activación y función no es conocida en su totalidad, una o varias de ellas podrían ser nucleasas que son expresadas o activadas rápidamente por IFN- γ y que se unen a sitios específicos de respuesta en el RNAm de *ABCA1* para su posterior degradación. Otro mecanismo podría ser opuesto al anterior, donde IFN- γ activa un factor proteico, cuya función es desestabilizar la actividad de proteínas inhibidoras de RNAasas que le brindan estabilidad, ocasionando que cuando el mensajero queda sin esta protección es vulnerable a ser degradado por ribonucleasas presentes en el núcleo.

Se han realizado estudios manipulando la regulación negativa de la ruta de señalización de IFN- γ , usando para ello la proteína SOCS-1, que de forma natural parece ejercer esta función (154-155). Se ha demostrado *in vitro* que SOCS se une e

inhibe la actividad cinasa de Jak2, inhibiendo por consecuencia la activación de Stat 1 (156-158). Por lo tanto, la inducción de la expresión de esta proteína repercutiría en una retroalimentación negativa para la inducción de la expresión de un subgrupo de genes inducibles por IFN- γ regulados por medio de la ruta de señalización dependiente de Stat1 (63), pudiéndose encontrar entre ellos *ABCA1*. Sin embargo, estudios realizados en ratones deficientes en Jak2, demostraron que esta mutación causó letalidad embrionaria debido a la ausencia definitiva de eritropoyetina (159). Estos cambios letales en el individuo se observarían con cualquier bloqueador de algún punto de la ruta de señalización de IFN- γ . Por lo anterior, se debe continuar el estudio de este proceso, con un enfoque en la determinación y caracterización de la proteína o proteínas que intervienen en él. La determinación minuciosa de este mecanismo, brindaría la posibilidad futura de su manipulación, diseñando una molécula bloqueadora de la proteína o proteínas causantes de la degradación del RNAm de *ABCA1*, sin bloquear así los efectos benéficos que IFN- γ desencadena en los procesos inflamatorios y de defensa del huésped.

8. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio demostraron que IFN- γ media la regulación a la baja de *ABCA1*, con cinéticas consistentes de un proceso dependiente de Stat1. La regulación a la baja de RNAm de *ABCA1* es a través de un proceso post-transcripcional, dependiente de síntesis de proteína. Los resultados fueron consistentes con el efecto general que se ha reportado para IFN- γ en la regulación a la baja de receptores involucrados en el tránsito de colesterol en el macrófago. La cinética observada en la expresión de la proteína de *ABCA1* corresponde a la observada en la expresión del RNAm, sugiriendo una rápida degradación de la proteína mediada por IFN- γ , donde la participación de las grandes rutas de degradación proteicas no están presentes.

Estos datos sugieren la continuación de estudios que permitan profundizar en el mecanismo y caracterizar a sus componentes para acercarnos a la posibilidad en el futuro de manipular el proceso por medio de moléculas farmacológicas específicas sin tener efectos colaterales adversos para el huésped.

Claramente los resultados de las cinéticas del RNAm y de la proteína de *ABCA1* requieren de una perspectiva diferente de regulación dirigida hacia un gen de respuesta rápida a IFN- γ y presuntamente a otros mediadores del proceso inflamatorio implicados en la placa aterosclerótica.

9.0 BIBLIOGRAFÍA

1. Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999; **340**:115–126.
2. Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science.* 1986; **232**: 34–47.
3. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J. Clin. Invest.* 2002; **109**: 1125-1131.
4. Goldstein JL, Ho JK, Basu SK, Brown MS. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1979; **76**:333–337.
5. Fidge NH. High density lipoprotein receptors, binding protein and ligands. *J Lipid Res.* 1999; **40**: 187-201.
6. Pittman RC, Knech TP, Rosenbaum MS, Taylor CA, Jr. A nonendocytotic mechanism for the selective uptake of high density lipoprotein associated cholesterol ester. *J Biol Chem.* 1987; **262**: 2443-2450.
7. Connelly MA, Klein SM, AZhar S, Abumrad NA, Williams DL. Comparison of class B scavenger receptors, CD36 and scavenger receptor BI (SR-BI) shows that both receptors mediate high density lipoproteins-cholesteryl ester selective uptake but SR-BI exhibits a unique enhancement of cholesteryl ester uptake. *J Biol Chem.* 1999; **274**: 41-47.

8. Connelly MA, Llera-Moya M, Monzo P, Yancey PG, Drazul D, Stoudt G, Fournier N, Klein SM, Rothblat GH, Williams DL. Analysis of chimeric receptors shows that multiple distinct functional activities of scavenger receptor, class B, type I (SR-BI), are localized to the extracellular receptor domain. *Biochemistry*. 2001;**40**: 5249–5259
9. Uittenbogaard A, Everson WV, Matveev SV, Smart EJ. Cholesteryl ester is transported from caveolae to internal membranes as part of a caveolin-annexin II lipid-protein complex. *J. Biol. Chem.* 2002; **277**:4925–4931.
10. Brown MS, Ho JK, Goldstein JL. The cholesteryl ester cycle in macrophage foam cells. Continual hydrolysis and re-esterification of cytoplasmic cholesteryl esters. *J. Biol. Chem.* 1980; **255**: 9344–9352.
11. Rudel LL, Shelness GS. Cholesterol esters and atherosclerosis—a game of ACAT and mouse. *Nat Med.* 2000; **6**:1313-1314.
12. Eckardstein A. Cholesterol efflux from macrophages and other cells. *Curr. Opin. Lipidol.* 1996; **7**: 308–319.
13. Ho YK, Brown MS, Goldstein JL. Hydrolysis and excretion of cytoplasmic cholesteryl esters by macrophages: stimulation by high density lipoprotein and other agents. *J. Lipid Res.* 1980; **21**:391–398.
14. Li Q, Tsujita M, Yokoyama S. Selective down-regulation by protein kinase C inhibitors of apolipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux in macrophages. *Biochemistry*. 1997; **36**:12045–12052.
15. Khoo JC, Mahoney EM, Steinberg D. Neutral cholesterol esterase activity in macrophages and its enhancement by AMPc-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 1981; **256**: 12659–12661.

16. Sakr SW, Williams DL, Stoudt GW, Phillips MC, Rothblat GH. Induction of cellular cholesterol efflux to lipid-free apolipoprotein A-I by cAMP. *Biochem Biophys Acta*. 1999; **1438**: 85–98.
17. Guyton JR, Klemp KF. Development of the lipid core in human atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996; **16**: 4-11
18. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Schwartz SM. Lessons from sudden coronary death. A comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000; **20**:1262-1275.
19. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002; **420**:868-874.
20. McMillan DE. Blood flow and the localization of atherosclerotic plaques. *Stroke* 1985; **16**:582-587.
21. Linton MF, Fazio S. Macrophages, inflammation, and atherosclerosis. *Internatl J Obesity*. 2003; **27**: S35-S40.
22. Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis: The road ahead. *Cell*. 2001; **104**: 503-516.
23. Hansson GK, Berne GP. Atherosclerosis and the immune system. *Acta Paediatr Suppl*. 2004; **446**: 63-69.
24. Tabas I. Consequences of cellular cholesterol accumulation: Basic concepts and physiological implications. *J Clin Invest*. 2002; **110**: 905-911.
25. Vainio S, Ikonen E. Macrophage cholesterol transport: A critical player in foam cell formation. *Ann Med*. 2003; **35**: 146-155.
26. Szmitko PE, Wang C-H, Weisel RD, de Almeida JR, Anderson TJ, Verma S. New markers of inflammation and endothelial cell activation. *Circulation*. 2003; **108**: 1917-1923.

27. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *New Engl J Med.* 2005; **352**: 1685-1695.
28. Langheinrich AC, Bohle RM. Atherosclerosis: humoral and cellular factors of inflammation. *Virchows Arch.* 2005; **446**: 101-111.
29. Getz GS. Immune function in atherogenesis. *J Lipid Res.* 2005; **46**: 1-10.
30. Mehrabian M, Allayee H. 5-Lipoxygenase and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 2003; **14**: 447-457.
31. Kalinina N, Agrotis A, Tararak E, Antropova Y, Kanellakis P, Ilyinskaya O. Cytochrome b558-dependent NAD(P)H oxidase-phox units in smooth muscle and macrophages of atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; **22**: 2037-2043.
32. Duffield JS. The inflammatory macrophage: A story of Jekyll and Hyde. *Clinical Science.* 2003; **104**: 27-38.
33. Six I, Mouquet F, Corseaux D, Bordet R, Letourneau T, Vallet B, Dosquet CC, Dupuis B, Jude B, Bertrand ME, Bauters C, Van Belle E. Protective effects of basic fibroblast growth factor in early atherosclerosis. *Growth Factors.* 2004; **22**: 157-167.
34. Zuckerman SH, Evans GF, O'Neal L. Cytokine regulation of macrophage apo E secretion: opposing effects of GM-CSF and TGF- β . *Atherosclerosis.* 1992; **96**: 203-214.
35. Panousis CG, Evans G, Zuckerman SH. TGF- β increases cholesterol efflux and ABC-1 expression in macrophage-derived foam cells: opposing the effects of IFN- γ . *J Lipid Res.* 2001; **42**: 856-863.

36. Mallat Z, Gojova A, Marchiol-Fournigault C, Esposito B, Kamate C, Merval R, et al. Inhibition of transforming growth factor-beta signaling accelerates atherosclerosis and induces an unstable plaque phenotype in mice. *Circ Res.* 2001; **89**: 930-934.
37. Oslund LJP, Hedrick CC, Olvera T, Hagenbaugh A, Territo M, Berliner JA, et al. Interleukin-10 blocks atherosclerotic events *in vitro* and *in vivo*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; **19**: 2847-2853.
38. Hakala JK, Oksjoki R, Laine P, Du H, Grabowski GA, Kovanen PT et al. Lysosomal enzymes are released from cultured human macrophages, hydrolyze LDL *in vitro*, and are present extracellularly in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; **23**: 1430-1436.
39. Liu J, Sukhova GK, Sun J-S, Xu W-H, Libby P, Shi G-P. Lysosomal cysteine proteases in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; **24**: 1359-1366.
40. Sukhova GK, Zhang Y, Pan J-H, Wada Y, Yamamoto T, Naito M, et al. Deficiency of cathepsin S reduces atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; **111**: 897-906.
41. Sukhova GK, Shi G-P, Simon DI, Chapman HA, Libby P. Expression of the elastolytic cathepsins S and K in human atheroma and regulation of their production in smooth muscle cells. *J Clin Invest.* 1998; **102**: 576-583.
42. Umehara H, Bloom ET, Okazaki T, Nagano Y, Yoshie O, Imai T. Fractalkine in vascular biology: From basic research to clinical disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; **24**: 34-40.
43. Boisvert WA. Modulation of atherogenesis by chemokines. *Trends Cardiovasc Med.* 2004; **14**: 161-165.

44. Mallat Z, Corbaz A, Scoazed A, Besnard S, Leseche G, Chvatchko Y, et al. Expression of interleukin-18 in human atherosclerotic plaques and relation to plaque instability. *Circulation*. 2001; **104**: 1598-1603.
45. Martinet W, De Meyer GRY, Herman AG, Koch MM. Reactive oxygen species induce RNA damage in human atherosclerosis. *Eur J Clin Invest*. 2004; **34**: 323-327.
46. Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon- γ . *Annu Rev Immunol*. 1997; **15**: 749-795.
47. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol*. 2004; **75**: 163-189.
48. Sad S, Marcotte R, Mosmann TR. Cytokine-induced differentiation of precursor mouse CD8⁺ T cells into cytotoxic CD8⁺ T cells secreting Th1 or T2 cytokines. *Immunity*. 1995; **2**: 271-279.
49. Munder M, Mallo M, Eichmann K, Modolell M. Murine macrophages secrete interferon gamma upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: A novel pathway of autocrine macrophage activation. *J Exp Med*. 1998; **187**: 2103-2108.
50. Hansson GK, Holm J, Jonasson L. Detection of activated T lymphocytes in the human atherosclerotic plaque. *Am J Pathol*. 1989; **135**: 169-175.
51. Yoshimoto T, Takeda K, Tanaka T, Ohkusu K, Kashiwamura S, Okamura H, et al. IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN-gamma production. *J Immunol*. 1998; **161**: 3400-3407.

52. Gerdes N, Sukhova GK, Libby P, Reynolds RS, Young JL, Schonbeck U. Expression of Interleukin (IL)-18 and functional IL-18 receptor on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: Implications for atherogenesis. *J Exp Med.* 2002; **195**: 245-257.
53. Walter MR, Windsor WT, Nagabhushan TL, Lundell DJ, Lunn CA, Zauodny PJ, Narula SK. Crystal structure of a complex between interferon- γ and its soluble high-affinity receptor. *Nature* 1995; **376**:230-235.
54. Krause CD, Mei E, Xie J, Jia Y, Bopp MA, Hochstrasser RM, Pestka S. Seeing the light: preassembly and ligand-induced changes of the interferon- γ receptor complex in cells. *Mol Cell Proteomics.* 2002; **1**: 805-815.
55. Igarashi K, Garotta G, Ozmen L, Zierniecki A, Wilks AF, Harpur AG, Larner AC, Finbloom DS. Interferon-gamma induces tyrosine phosphorylation of interferon- γ receptor and regulated association of protein kinases, Jak1 and Jak2, with its receptor. *J Biol Chem.* 1994; **269**: 14333-14336.
56. Briscoe J, Rogers NC, Witthuhn BA, Watling D, Harpur AG, Wilks AF, Stark GR, Ihle JN, Kerr IM. Kinase-negative mutants of Jak1 can sustain interferon-gamma-inducible gene expression but not an antiviral state. *EMBO J.* 1996; **15**: 799-809.
57. Greenlund AC, Farrar MA, Viviano BL, Schreiber RD. Ligand induced IFN- γ receptor tyrosine phosphorylation couples the receptor to its signal transduction system. *EMBO J.* 1994; **13**: 1591-1600.
58. Heim MH, Kerr IM, Stark GR, Damell JE. Contribution of Stat1 SH2 groups to specific interferon signaling by the Jak-Stat pathway. *Science.* 1995; **267**: 1347-1349.

59. Nguyen H, Ramana CV, Bayes J, Stark GR. Roles of phosphatidylinositol 3-kinase in interferon- γ -dependent phosphorylation of STAT1 on serine 727 and activation of gene expression. *J Biol Chem.* 2001; **276**: 33361-33368.
60. Sato M, Taniguchi T, Tanaka N. The interferon system and interferon regulatory factor transcription factors – studies from gene knockout mice. *Cytokine & Growth Factor Rev.* 2001; **12**: 133-142.
61. Taniguchi T, Ogasawara K, Takaoka A, Tanaka N. IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annu Rev Immunol.* 2001; **19**: 623-655.
62. Gil MP, Bohn E, O'Guin AK, Ramana CV, Levine B, Stark GR. Biologic consequences of Stat1-independent IFN signaling. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; **98**: 6680-6685.
63. Ramana CV, Gil MP, Han Y, Ransohoff RM, Schreiber RD, Stark GR. Stat1-independent regulation of gene expression in response to IFN- γ . *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; **98**: 6674-6679.
64. Ramana CV, Gil MP, Schreiber RD, Stark GR. Stat1-dependent and independent pathways in IFN- γ -dependent signaling. *Trends Immunol.* 2002; **23**: 96-101.
65. Qing Y, Stark GR. Alternative activation of Stat1 and Stat3 in response to interferon- γ . *J Biol Chem.* 2004; **279**: 41679-41685.
66. Takaoka A, Tanaka N, Mitani Y, Miyazaki T, Fujii H, Sato M, Kovari K, Decker T, Schlessinger J, Taniguchi T. Protein tyrosine kinase Pyk2 mediates the Jak-dependent activation of MAPK and Stat1 in IFN- γ , but not IFN- α signaling. *EMBO J.* 1999; **18**: 2480-2488.

67. Sizemore N, Agarwal A, Das K, Lerner N, Sulak M, Rani S, Ransohoff R, Shultz D, Stark GR. Inhibitor of kappa β kinase is required to activate a subset of interferon γ -stimulated genes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; **101**: 7994-7998.
68. Alexander WS, Hilton DJ. The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response. *Annu Rev Immunol*. 2004; **22**: 503-529.
69. Yamada S, Shiono S, Joo A, Yoshimura A. Control mechanism of Jak/Stat signal transduction pathway. *FEBS Letts*. 2003; **534**: 190-196.
70. Yasukawa H, Misawa H, Sakamoto H, Masuhara M, Sasaki A, Wakioka T, Ohtsuka S, Imaizumi T, Matzuda T, Ihle JN, Yoshimura A. The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop. *EMBO J*. 1999; **18**: 1309-1320.
71. Ungureanu D, Saharinen P, Junttila I, Hilton DJ, Silvennoinen O. Regulation of Jak2 through the ubiquitin-proteasome pathway involves phosphorylation of Jak2 on Y1007 and interaction with SOCS-1. *Mol Cell Biol*. 2002; **22**: 3316-3326.
72. You M, Yu D-H, Feng G-S. Shp-2 tyrosine phosphatase functions as a negative regulator of the interferon-stimulated Jak/Stat pathway. *Mol Cell Biol*. 1999; **19**: 2416-2424.
73. Liu B, Liao J, Rao X, Kushner SA, Chung CD, Chang DD, Shuai K. Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; **95**:10626-10631.

74. Song MM, Shuai K. The suppressor of cytokine signaling (SOCS) 1 and SOCS3 but not SOCS2 proteins inhibit interferon-mediated antiviral and antiproliferative activities. *J Biol Chem*. 1998; **273**: 35056-35062.
75. Starr R, Wilson TA, Viney EM, Murray LJ, Rayner JR, Jenkins BJ, Gonda TJ, Alexander Ws, Metcalf D, Nicola NA, Hilton DJ. A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* .1997; **387**: 917-921.
76. Ito S, Ansari P, Sakatsume M, Dickensheets H, Vazquez N, Donnelly RP, Larner A. C. Interleukin-10 inhibits expression of both interferon α -and interferon- γ induced genes by suppressing tyrosine phosphorylation of Stat1. *Blood*. 1999; **93**:1456-1463.
77. Camejo EH, Rosengren B, Camejo G, Sartipy P, Fager G, Bonders G. Interferon gamma binds to extracellular matrix chondroitin-sulfate proteoglycans, thus enhancing its cellular response. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995; **15**: 1456-1465.
78. Camejo EH, Rosengren B, Sartipy P, Elfsberg K, Camejo G, Svensson L. CD44, a cell surface chondroitin sulfate proteoglycan, mediates binding of interferon- γ and some of its biological effects on human vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 1999; **274**: 18957-18964.
79. Wuttge DM, Zhou X, Sheikine Y, Wagsater D, Stemme V, Hedin U, Stemme S, Hansson GK, Sirsjo A. CXCL16/SR-PSOX is an interferon- γ -regulated chemokine and scavenger receptor expressed in atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004; **24**: 750-755.

80. Geng Y-J, Hansson GK. Interferon-gamma inhibits scavenger receptor expression and foam cell formation in human monocyte-derived macrophages. *J Clin Invest.* 1992; **89**: 1322-1330.
81. Nakagawa T, Nozaki S, Nishida M, Yakub JM, Tomiyama Y, Nakata A, Matsumoto K, Funahashi T, Kameda-Takemura K, Kurata Y, Yamashita S. . Oxidized LDL increases and interferon-gamma decreases expression of CD36 in human monocyte-derived macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998; **18**: 1350-1357.
82. Panousis CG, Zuckerman SH. Regulation of cholesterol distribution in macrophage-derived foam cells by interferon- γ . *J Lipid Res.* 2000; **41**: 75-83.
83. Grewal T, Priceputu E, Davignon J, Bernier L. Identification of a (gamma)-interferon-responsive element in the promoter of the human macrophage scavenger receptor A gene. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; **21**: 825-831.
84. LaMarre J, Wolf BB, Kittler ELS, Quesenberry PJ, Gonias SL. Regulation of macrophage α -2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein by lipopolysaccharide and interferon- γ . *J Clin Invest.* 1993; **91**: 1219-1224.
85. Kosaka S, Takahashi S, Masamura K, Kanehara H, Sakai J, Tohda G, Okada D, Oida K, Iwasaki T, Hattori H, Kodama T, Yamamoto T, Miyamori I. Evidence of macrophage foam cell formation by very low-density lipoprotein receptor: Interferon-gamma inhibition of very low-density lipoprotein receptor expression and foam cell formation in macrophages. *Circulation.* 2001; **103**: 1142-1147.
86. Skiba PJ, Keesler GA, Tabas I. Interferon-gamma down-regulates the lipoprotein (a)/apoprotein (a) receptor activity on macrophage foam cells.

- Evidence for disruption of ligand-induced receptor recycling by interferon-gamma. *J Biol Chem.* 1994; **269**: 23059-23067.
87. Panousis CG, Zuckerman SH. Interferon- γ induces down-regulation of Tangier disease gene (ATP-binding-cassette transporter 1) in macrophage-derived foam cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; **20**: 1565-1571.
88. Oropeza RL, Schreiber R, Werb Z. Regulation of apolipoprotein E expression in macrophages by γ -interferon. In: Sorg, C. and Schimpl, S. (Eds.), Cellular and Molecular Biology of Lymphokines, Academic Press, NY 1985, p 303-307.
89. Garner B, Baoutina A, Dean RT, Jessup W. Regulation of serum-induced lipid accumulation in human monocyte-derived macrophages by interferon-gamma. Correlations with apolipoprotein E production, lipoprotein lipase activity and LDL receptor-related protein expression. *Atherosclerosis.* 1997; **128**: 47-58.
90. Reiss AB, Patel CA, Rahman MM, Chan ESL, Hasneen K, Montesinos MC, et al. Interferon- γ impedes reverse cholesterol transport and promotes foam cell transformation in THP-1 human monocytes/macrophages. *Med Sci Monit.* 2004; **10**: BR420-BR425.
91. Reiss AB, Awadallah NW, Malhotra S, Montesinos MC, Chan ESL, Javitt NB, Trachman JD, Cronstein BN. Immune complexes and IFN- γ decrease cholesterol 27-hydroxylase in human arterial endothelium and macrophages. *J Lipid Res.* 2001; **42**: 1913-1922.
92. Peilot H, Rosengren B, Bonders G, Hurt-Camejo E. Interferon- γ induces secretory group IIA phospholipase A₂ in human arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 2000; **275**: 22895-22904.

93. Goes N, Umson J, Hobart M, Halloran PF. The unique role of interferon- γ in the regulation of MHC expression on arterial endothelium. *Transplantation*. 1996; **62**:1889-1894.
94. Loukissa A, Cardozo C, Altschuller-Felberg C, Nelson JE. Control of LMP7 expression in human endothelial cells by cytokines regulating cellular and humoral immunity. *Cytokine*. 2000; **12**: 1326-1330.
95. Ma W, Lehner PJ, Cresswell P, Pober JS, Johnson DR. Interferon-gamma rapidly increases peptide transporter (TAP) subunit expression and peptide transport capacity in endothelial cells. *J Biol Chem*. 1997; **272**: 16585-16590.
96. Stemme S, Fager G, Hansson GK. MHC class II antigen expression in human vascular smooth muscle cells is induced by interferon-gamma and modulated by tumour necrosis factor and lymphotoxin. *Immunol*. 1990; **69**:2 43-249.
97. Yla-Herttuala S, Palinski W, Butler SW, Picard S, Steinberg D, Witztum JL. Rabbit and human atherosclerotic lesions contain IgG that recognizes epitopes of oxidized LDL. *Arterioscler Thromb*. 1994; **14**: 32-40.
98. Mahboubi K, Pober JS. Activation of signal transducer and activator of transcription 1 (Stat1) is not sufficient for the induction of Stat1-dependent genes in endothelial cells. *J Biol Chem*. 2002; **277**: 8012-8021.
99. Melrose J, Tsurushita N, Liu G, Berg EL. IFN- γ inhibits activation-induced expression of E-and P-selectin on endothelial cells. *J Immunol*. 1998; **161**:2457-2464.
100. Stewart RJ, Kashour TS, Marsden PA. Vascular endothelial platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) expression is decreased by TNF alpha and IFN-gamma: Evidence for cytokine-induced destabilization of

- messenger ribonucleic acid transcripts in bovine endothelial cells. *J Immunol.* 1996; **156**: 1221-1228.
101. Mach F, Sauty A, Iarossi AS, Sukhova GK, Neote K, Libby P, Luster AD. Differential expression of three T lymphocyte-activating CXC chemokines by human atheroma-associated cells. *J Clin Invest.* 1999; **104**: 1041-1050.
102. Wagner AH, Gebauer M, Pollok-Kopp B, Hecker M. Cytokine-inducible CD40 expression in human endothelial cells is mediated by interferon regulatory factor-1. *Blood* 2002; **99**: 520-525.
103. Higgins CF. The ABC of channel regulation. *Cell* . 1992; **82**: 693-696
104. Rust S, Rosier M, Funke H, Real J, Piette JC, Deleuze JB, Brewer HB, Duverger N, Deneffe P, Assmann G. Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP- binding cassette transporter 1. *Nat Genet.* 1999; **22**: 352-355.
105. Dean M, Yannick H, Allikment R, Chimini G. ABC transporters: from gene to disease. *J Lipid Res.* 2001; **42**: 1007-1017.
106. Bungert S, Molday LL, Molday RS. Membrane topology of the ATP-binding cassette transporter ABCR and its relationship to ABC1 and related ABCA transporters: identification of N-linked glycosylation sites. *J Biol. Chem.* 2001; **276**: 23539-23546.
107. Fitzgerald ML, Morris AL, Rhee JS, Andersson LP, Mendez AJ, and Freeman MW. Naturally occurring mutations in the largest extracellular loops of ABCA1 can disrupt its direct interaction with apolipoprotein A-I. *J. Biol. Chem.* 2002; **277**: 33178 – 33187.
108. Buechler C, Boettcher A, Bared SM, Probst MC, Schmitz G. The carboxy terminus of the ATP-binding cassette transporter A1 interacts with a beta2-

syntrophin/utrophin complex. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; **293**: 759-765.

109. Fitzgerald ML, Okuhira K, Short III GF, Manning JJ, Bell SA, Freeman MW. ATP-binding Cassette Transporter A1 Contains a Novel C-terminal VFNFA Motif That Is Required for Its Cholesterol Efflux and ApoA-I Binding Activities *J. Biol. Chem.* 2004; **279**: 48477 - 48485.
110. Stefkova J, Poledne R, Hubacek A. ATP- binding cassette (ABC) transporters in human metabolism and disease. *Physiol Res.* 2004; **53**: 235-243.
111. Pullinger CR, Hakamata H, Duchateau PN, Eng C, Aouizerat BE, Cho MH, Fielding CJ, Kane JP. Análisis of ABC1 gene 5'end : Additional peptide séquence promoter region and four polymorphism. *Biochem Biophys Res Común.* 2000; **71**: 451-455.
112. Remaley AT, Rust S, Rosier M , Knapper C, Naudin L, Broccardo C, Peterson KM, Koch C, Arnould I, Prades C, Duverger N, Funke H, Assman G, Dinger M, Dean M, Chimini G, Santamarina-Fojo S, Fredrickson DS, Deneffe P, and Brewer HB Jr. Human ATP-binding cassette transporter 1 (ABC1): Genomic organization and identification of the genetic defect in the original Tangier disease kindred. *PNAS.* 1999; **96**: 12685-12690
113. Santamarina-Fojo S, Peterson K , Knapper C, QiuY, Freeman L, Cheng JF, Osorio J, Remaley A, Yang XP, Haudenschild CH, Prades C, Chimini G, Blackmon E, Francois T, Duverger N, Rubin EM, Rosier M, Denèfle P, Fredrickson DS, , Brewer HB Jr. Complete genomic sequence of the human *ABCA1* gene: Analysis of the human and mouse ATP-binding cassette A promoter. *PNAS.* 2000; **97**: 7987-7992.

114. Costet P, Luo Y, Wang N, Tall AR. Sterol- dependent transcription activation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoic X receptor. 2000, *J Biol. Chem.* **275**: 28240-28245.
115. Langmann T, Klucken J, Reil M, Liebisch G, Luciani MF, Chimini G, Kaminski WE, Schmitz G. Molecular cloning of the human ATP-binding cassette transporter 1 (hABC1): Evidence for sterol- dependent regulation in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; **257**: 29-33.
116. Neufeld EB, Tall AR, Demosky SJ, Stonik JA, Santamarina-Fojo S, Grever HB Jr. Cellular localization and trafficking of the human ABCA1 transporter. *J Biol. Chem.* 2001; **276**: 27584-27590.
117. Oram JF, Vaughan AM, Stoker R. ATP-binding cassette transporter A1 mediates cellular secretion of α -tocopherol. *J Biol. Chem.* 2001; **276**: 39898-39902.
118. Eckardstein A, Langer C, Engel T, Schaukal I, Cignarella A, Reinhardt J, Lorkowski S, Li Z, Zhou X, Cullen P, Assmann G, von G. ATP-binding cassette transporter ABCA1 modulates the secretion of apolipoprotein E from human monocyte-derived macrophages. *FASEB J.* 2001; **15**: 1555-1561.
119. Marcil M, Brooks-Wilson A, Clee MS, Roomp K, Zhang LH, Yu L, Collins A, Dam M, Molhuizen HOF, Loubster O, Oullrte BFF, Sensen CW, Fichter SK, Mott S, Denis M, Boucher B, Pimstone S, Genest JJr, Kestelein JJP, Hyden MR. Mutations in the ABC1 gene familial deficiency with defective cholesterol efflux. *The Lancet.* 1999; **354**: 1341-1346.

120. Chang G , Roth CB. Structure of MsbA from E. coli: a homolog of the multidrug resistance ATP binding cassette (ABC) transporters. *Science*. 2001; **293**: 1793-1800.
121. Chang G. Structure of MsbA from *Vibrio cholera*: a multidrug resistance ABC transporter homolog in close conformation. *J Mol Biol*. 2003; **330**: 419-430.
122. Lin G, Bornfeldt KE. Cyclic AMP- specific phosphodiesterase 4 inhibitors promote ABCA1 expression and cholesterol efflux. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002; **290**: 263-269.
123. Denis M, Haidar B, Marcil M, Bouvier M, Krimbou L, , Genest J. Characterization of oligomeric human ATP binding cassette transporter A1. Potential implications for determining the structure of nascent high density lipoprotein particles. *J Biol Chem*. 2004; **279**: 42529-41536
124. Ramjeesing M, Li C, Kogan I, Wang Y, Huan LJ, Bear CE. A monomer is the minimum functional unit required for channel and ATPase activity of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Biochemistry*. 2001; **45**: 1929-1942.
125. Repa JJ, Turley SD, Lobaccaro JA, Medina J, Li I, Lustig K. Regulation of absorption and ABCA1- mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science*. 2000; **28**: 1524 1529.
126. Schwartz K, Lawn RM, Wade DP. ABC1 gene expression and apo-AI mediated cholesterol efflux are regulated by LXR. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000; **274**: 794-802.
127. Costet P, Luo Y, Wang N, Tall AR. Sterol-dependent transactivation of ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor. *J Biol Chem*. 2000; **275**: 28240-28245.

128. Uehara Y, Engel T, Li Z, Goepfert C, Rust S, Zhou X, Langer C, Schachtrup C, Wiekowski J, Lorkowski S, Assmann G, von Eckardstein A. Polyunsaturated fatty acids and acetoacetate downregulate the expression of the ATP-binding cassette transporter A1. *Diabetes*. 2002; **51**: 2922-2928.
129. Oram JF, Lawn RM, Wade DP. ABCA1 is the cAMP-inducible apolipoprotein receptor that mediates cholesterol secretion from macrophages. *J Biol Chem*. 2000; **275**: 34508-34511.
130. Chinnetti G, Lestavel S, Bocher B, Remaley AT, Neve B, Torra IP. PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of ABCA1 pathway. *Nat Med*. 2001; **7**: 53-58
131. Cavelier LB, Qiu Y, Bielicki JK, Afzal V, Cheng JF, Rubin EM. Regulation and activity of the human ABCA1 gene in transgenic mice. *J Biol Chem*. 2001; **278**: 18046-18051
132. Vaisman VL, Lambert G, Amar M, Joyce C, Ito T, Shamburek RD, Cain WJ, Fruchart-Najib J, Neufeld ED, Remaley AT, Brewer HB Jr, Santamarina-Fojo SJ. ABCA1 overexpression leads to hyperalphalipoproteinemia and increased biliary cholesterol excretion in transgenic mice. *J Clin Invest*. 2001; **108**: 303-309.
133. Arakawa R. , Yokoyama S. Helical Apolipoproteins Stabilize ATP-binding Cassette Transporter A1 by Protecting It from Thiol Protease-mediated Degradation. *J Biol Chem*. 2002; **277**: 22426 – 22429.
134. Wang N, Lan D, Chen W, Matsuura F, Tall AR. ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins. *PNAS*. 2004; **101**: 9774 - 9779.

135. Baranova I, Vishnyakova T, Bocharov A, Chen Z, Tall AR, Stonik J, Eggerman T, Patterson A. Lipopolysaccharide down regulates both scavenger receptor B1 and ATP binding cassette transporter A1 in RAW cells. *Infect Immun.* 2002; **70**: 2995-3003
136. Wang XQ, Panousis CG, Alfaro ML, Evans GF, Zuckerman SH. Interferon- γ mediated downregulation of cholesterol efflux and ABC1 expression is by the Stat1 pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; **22**: e5-e9.
137. Waite KJ, Floyd ZE, Arbour-Reily P, Stephens JM. Interferon- γ induced Regulation of Peroxisome Proliferator-activated Receptor- γ and STATs in Adipocytes. 2001; *J. Biol. Chem.* 276; **10**: 7062-7068.
138. Hansson GK, Libby P, Schoenbeck U, Yan ZQ. Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ Res.* 2002; **91**: 281-291.
139. Li H, Freeman MW, Libby P. Regulation of smooth muscle cell scavenger receptor expression in vivo by atherogenic diets and *in vitro* by cytokines. *J Clin Invest.* 1995; **95**:122–133.
140. Hussaini IM, LaMarre J, Lysiak J, Karns LR, VandenBerg SR, Gonias SL. Transcriptional regulation of LDL receptor-related protein by IFN- γ and the antagonistic activity of TGF- β 1 in the RAW 264.7 macrophage-like cell line. *J Leukoc Biol.* 1996; **59**: 733-739.
141. Kosaka S, Takahashi S, Masamura K, Kanehara H, Sakai J, Tohda G, Okada E, Oida K, Iwasaki T, Hattori H, Kodama T, Yamamoto T, Miyamori I. Evidence of macrophage foam cell formation by very low-density lipoprotein receptor: Interferon-(gamma) inhibition of very low-density lipoprotein receptor

- expression and foam cell formation in macrophages. *Circulation* 2001; **103**: 1142-1147.
142. Penton-Rol G, Polentarutti N, Luini W, Borsatti A, Mancinelli R, Sica A, Sozzani S, Mantovani A. Selective inhibition of expression of the chemokine receptor CCR2 in human monocytes by IFN- γ . *J Immunol.* 1998; **160**: 3869-3873.
143. Gupta SK, Lysko PG, Pillarisetti K, Ohlstein E, Stadel JM. Chemokine receptors in human endothelial cells. Functional expression of CXCR4 and its transcriptional regulation by inflammatory cytokines. *J Biol Chem.* 1998; **273**: 4282-4287.
144. Radzioch D, Varesio L. c-fos mRNA expression in macrophages is downregulated by interferon- γ at the posttranscriptional level. *Mol Cell Biol.* 1991; **11**: 2718-2722.
145. Ohmori Y, Hamilton TA. IFN-gamma selectively inhibits lipopolyscharide-inducible JE/monocyte chemoattractant protein-1 and KC/GRO/ melanoma growth-stimulating activity gene expression in mouse peritoneal macrophages. *J Immunol.* 1994; **153**: 2204-2212.
146. Gan X, Kaplan R, Menke JG, MacNaul K, Chen Y, Sparrow C, Zhou G, Wright SD, Cai TQ. Dual mechanisms of ABC1 regulation by Geranylgeranyl pyrophosphate. *J Biol Chem.* 2001; **52**: 48702-48708.
147. Uehara Y, Engel T, Li Z, Goepfert C, Rust S, Zhou X, Langer C, Schachtrup C, Wiekowski J, Lorkowski S, Assmann G, von Eckardstein A. Polyunsaturated fatty acids and acetoacetate downregulate the expression of the ATP-binding cassette transporter A1. *Diabetes.* 2002; **51**: 2922-2928.

148. Porsch-Özcürümez M, Langmann T, Heimerl S, Borsukova H, Kaminski WE, Drobnik W, Honer C, Schumacher C, Schmitz G. The zinc finger protein 202 (ZNF202) is a transcriptional repressor of ATP binding cassette transporter A1 (ABCA1) and ABCG1 gene expression and a modulator of cellular lipid efflux. *J Biol Chem.* 2001; **276**: 12427-12433.
149. Sone H, Shimano H, Shu M, Nakakuki M, Takahashi A, Sakai M, Sakamoto Y, Yokoo T, Matsuzaka K, Okazaki H, Nakagawa Y, Iida KT, Suzuki H, Toyoshima H, Horiuchi S, Yamada N. Statins downregulate ATP-binding-cassette transporter A1 gene expression in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; **316**: 790-794.
150. Wong J, Quinn CM, Brown AJ. Statins inhibit synthesis of an oxysterol ligand for the liver X receptor in human macrophages with consequences for cholesterol flux. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; **24**: 2365-2371.
151. Feng B, Tabas I. ABCA1-mediated cholesterol efflux is defective in free cholesterol-loaded macrophages. Mechanism involves enhanced ABC1 degradation in a process requiring full NPC1 activity. *J Biol Chem.* 2002; **277**: 43271-43280.
152. Wang Y, Oram J. Unsaturated fatty acids inhibit cholesterol efflux from macrophages by increasing degradation of ATP-binding cassette transporter A1. *J Biol Chem.* 2002; **277**: 5692-5697.
153. Wang N, Chen W, Linsel-Nitschke P, Martinez LO, Agerholm-Larsen B, Silver DL, Tall AR. A PEST sequence in ABC1 regulates degradation by calpain protease and stabilization of ABC1 by apoA-I. *J Clin Invest.* 2003; **111**: 99-107.

154. Alexander WS, Hilton DJ. The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response. *Annu Rev Immunol.* 2004; **22**: 503-529.
155. Yamada S, Shiono S, Joo A, Yoshimura A. Control mechanism of Jak/Stat signal transduction pathway. *FEBS Letts.* 2003; **534**:190-196.
156. Ungureanu D, Saharinen P, Junttila I, Hilton DJ, Silvennoinen O. Regulation of Jak2 through the ubiquitin-proteasome pathway involves phosphorylation of Jak2 on Y1007 and interaction with SOCS-1. *Mol Cell Biol.* 2002; **22**: 3316-3326.
157. Kamizono S, Hanada T, Yasukawa H, Minoguchi S, Kato R, Minoguchi M, et al. The SOCS box of SOCS-1 accelerates ubiquitin-dependent proteolysis of TEL-JAK2. *J Biol Chem.* 2001; **276**: 12530-12538.
158. Qing Y, Costa-Pereira AP, Watling D, Stark GR. Role of tyrosine 441 of interferon- γ receptor subunit 1 in SOCS-1-mediated attenuation of Stat1 activation. *J Biol Chem.* 2005; **280**: 1849-1853.
159. Parganas E, Wang D, Stravopodis D, Topham DJ, Marine JC, Teglund S, Vanin EF, Bodner S, Colamonici OR, van Deursen JM, Grosveld G, Ihle JN. Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors. *Cell.* 1998; **93**: 385-395.

10. DIFUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Post-transcriptional regulation of macrophage ABCA1, an early response gene to IFN- γ

Martha Leticia Alfaro Leon^{a,1}, Glenn F. Evans^b, Mark W. Farnen^b, Steven H. Zuckerman^{b,*}

^a *Ciencias Biológicas Program, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Mexico*

^b *Lilly Research Laboratories, Eli Lilly & Co., Lilly Corporate Center, Indianapolis, IN 46285, USA*

Received 13 May 2005

Available online 31 May 2005

Abstract

Interferon- γ (IFN- γ) down-regulates receptors associated with reverse cholesterol transport including ABCA1. In the present study, the kinetics and mechanism of ABCA1 down-regulation were determined in mouse peritoneal macrophages. IFN- γ decreased ABCA1 mRNA 1 h following IFN- γ addition and was maximally reduced by 3 h. Down-regulation was protein synthesis dependent and involved post-transcriptional processes. ABCA1 message had a $T_{1/2}$ of 115 min in actinomycin treated cells that was reduced to a $T_{1/2}$ of 37 min by IFN- γ . The decrease in message stability was also associated with a rapid loss of ABCA1 protein, significant 3 h following IFN- γ addition. The kinetics of ABCA1 message and protein decrease was consistent with the early IFN- γ -induced changes in Stat1 phosphorylation and nuclear translocation observed in these cells. Therefore, ABCA1 can be considered as an early response gene to macrophage activation by IFN- γ with down-regulation occurring by message destabilization.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Interferon- γ ; ABCA1; Macrophage; Inflammation

Atherosclerosis reflects the convergence of both innate and adaptive immunity within the microenvironment of the atherosclerotic plaque [1–3]. The presence of activated macrophages and T cells provides the background for a chronic inflammatory process resulting in plaque progression and destabilization. The Th1 derived cytokine, interferon- γ (IFN- γ), contributes to cellular changes in macrophages, macrophage derived foam cells, and endothelial and smooth muscle cells associated with plaque pathology. These effects include but are not limited to the induction of adhesion molecules, Fas, CD40 and CD40 ligand, class II antigens, and the chemokine receptor CXCL16 [4–9]. IFN- γ has also been demonstrated to inhibit reverse cholesterol transport by decreasing apo E

secretion, increasing acyl coenzyme A:cholesterol-O-acyltransferase (ACAT), modulating type A and B scavenger receptors, and decreasing ATP-binding cassette transporter A1, (ABCA1) expression [10–14].

The importance of ABCA1 in mediating cholesterol efflux to lipid-poor apo A-I is evidenced, both by the phenotype of patients with Tangier disease where mutations in the ABCA1 gene have been demonstrated and pre-clinically in ABCA1 gene knockout mice [15–17]. The up-regulation of ABCA1 expression is mediated by the liver X receptor (LXR) and retinoid X receptor (RXR) nuclear receptor heterodimers, as well as by cAMP elevation [18,19], or following transforming growth factor- β (TGF- β) stimulation of macrophages [20]. Down-regulation of ABCA1 expression is observed following macrophage exposure to inflammatory stimuli including IFN- γ [14] and LPS [21] although the mechanism(s) involved remain unclear.

* Corresponding author. Fax: +1 317 433 2815.

E-mail address: Zuckerman_Steven@Lilly.com (S.H. Zuckerman).

¹ Pre-doctoral student.

Previous studies from this laboratory reported that the IFN- γ mediated decreases in macrophage ABCA1 expression were apparent 48 h after IFN- γ stimulation and dependent on the Stat1 pathway [14,22]. The present study was designed to determine the kinetics of ABCA1 message and protein down-regulation, in an attempt to determine whether ABCA1 regulation could be viewed as an "early response gene." We now report that both ABCA1 mRNA and protein are rapidly lost following IFN- γ addition with maximal losses of ABCA1 mRNA apparent by 3 h. ABCA1 mRNA down-regulation by IFN- γ involved post-transcriptional regulation resulting in message destabilization as the half-life was decreased from 115 to 37 min and was dependent on de novo protein synthesis. There was no evidence, in nuclear run-on experiments, that down-regulation of ABCA1 message involved transcriptional regulation. The down-regulation of ABCA1 mRNA was also associated with reduced levels of ABCA1 protein 3 h following IFN- γ addition. These changes were consistent with the rapid phosphorylation and translocation of Stat1 in these cells induced by IFN- γ . Therefore, down-regulation of ABCA1 by IFN- γ is a post-transcriptional response that occurs early in the process of IFN- γ -induced macrophage activation.

Materials and methods

Macrophage cultures. Thioglycollate elicited murine peritoneal macrophages and macrophage derived foam cells were prepared and maintained as previously described [12]. Unless specified, all reagents were from Sigma (St. Louis, MO) and Invitrogen Life Technologies (Rockville, MD). Animal care was in compliance with IACUC rules and regulations, and with institutional guidelines.

RNA studies. Macrophages were treated with 10 ng/ml of recombinant IFN- γ (Biosource International, Camarillo, CA) and at intervals between 0 and 48 h cells were lysed, total RNA isolated (RNeasy kit), and reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (Taqman RT-PCR) was performed as previously described [22]. Northern blot analysis was performed on poly(A) enriched mRNA isolated at 0, 1, and 3 h following IFN- γ addition using conditions and probes as previously described [14]. In studies designed to determine the stability of ABCA1 mRNA, macrophages were treated with 5 μ g/ml actinomycin D and lysed from 0 to 8 h post-IFN- γ addition. The requirement for de novo protein synthesis in ABCA1 mRNA down-regulation was determined in cycloheximide treated cells. Briefly, monolayers were incubated with 5 μ M cycloheximide, a concentration determined to inhibit greater than 95% of total protein synthesis (data not shown), lysed at 0 and 3 h, and ABCA1 and 18S quantified by RT-PCR.

Nuclear run-on assays were performed on macrophages 6 h after IFN- γ addition. Briefly, nuclei, 5×10^7 , were incubated with 300 μ l of 2 \times transcription mix (180 mM KCl, 50 mM DTT, 20 mM Tris, and 10 mM MgCl₂), 30 μ l of 10 \times nucleotide mix (10 mM dATP, 10 mM dCTP, and 10 mM dGTP), and 500 μ Ci [α -P³²]UTP at 37 °C for 10 min. Nuclei were lysed with 6 M guanidinium chloride, RNA extracted, and hybridized to immobilized probes for ABCA1, S29, and GAPDH.

Western blots. Macrophage or macrophage derived foam cells were stimulated with IFN- γ for 0–6 h and Western blots probed as previ-

ously described with antisera against murine ABCA1 (1378Glu-1566Val) [20] or heat shock protein 70 (HSP70) (Upstate Biologicals, Lake Placid, NY). The kinetics of Stat1 phosphorylation and translocation into the nucleus were determined 0–45 min after IFN- γ addition. Western blots on nuclear and cytosolic preparations were probed with anti-phospho-Stat1 (P-Stat1), anti Stat1 (Upstate Biologicals), and activating transcription factor 3 (ATF3) (C-19) (Santa Cruz Biotechnology, CA) antibodies.

Statistical analysis. Across multiple experiments, differences between the IFN- γ treated and vehicle treated macrophage cultures were evaluated by one- or two-way ANOVA. Significance of pairwise comparisons of groups was determined by Bonferroni adjusted *P* values. Significance was defined as *P* < 0.05. ABCA1 message levels were evaluated by a linear regression analysis for the early time points following IFN- γ addition. ABCA1 message stability was evaluated in actinomycin treated cells by an exponential decay model using a least-squares regression on mean expression. Confidence intervals were computed [23] and the time by which message is reduced by 50% calculated as the *T*_{1/2}.

Results

ABCA1 message and protein have previously been demonstrated to decrease in murine macrophages and macrophage derived foam cells 48 h after IFN- γ addition [14,20]. In the present study, the kinetics of ABCA1 down-regulation by IFN- γ were investigated. Macrophages were incubated with IFN- γ for 0–48 h, lysed, and ABCA1 mRNA was quantitated by RT-PCR and normalized to 18S RNA. As demonstrated (Fig. 1A), down-regulation of ABCA1 mRNA was detected 1 h following IFN- γ addition. ABCA1 mRNA levels were further reduced by 3 h and remained depressed at 48 h. The decrease in ABCA1 mRNA from 0 to 3 h was linear by regression analysis (Fig. 1B). The rapid decrease in ABCA1 mRNA was also evaluated by Northern blot analysis of poly(A) enriched mRNA. Consistent with the Taqman analysis, ABCA1 mRNA was significantly decreased 1 h following IFN- γ addition and approached the limits of detection by 3 h (Figs. 1C and D). This decrease occurred without any reduction in S29 message levels.

Nuclear run-on experiments were then performed on macrophages incubated with IFN- γ or vehicle for 6 h to determine whether the reduction in ABCA1 message was due to transcriptional regulation. As demonstrated, nuclear RNA isolated from control or IFN- γ treated macrophages had similar hybridization intensities to ABCA1 when normalized to either S29 or GAPDH cDNA probes (Fig. 2). Therefore, ABCA1 transcription was not reduced with macrophage activation suggesting that the decrease in ABCA1 mRNA in IFN- γ activated macrophages involved post-transcriptional regulation.

In an attempt to determine whether the rapid loss of ABCA1 mRNA was dependent on de novo protein synthesis, macrophages were incubated with IFN- γ in the presence or absence of cycloheximide. Following 3 h treatment, macrophages were lysed and ABCA1 mRNA

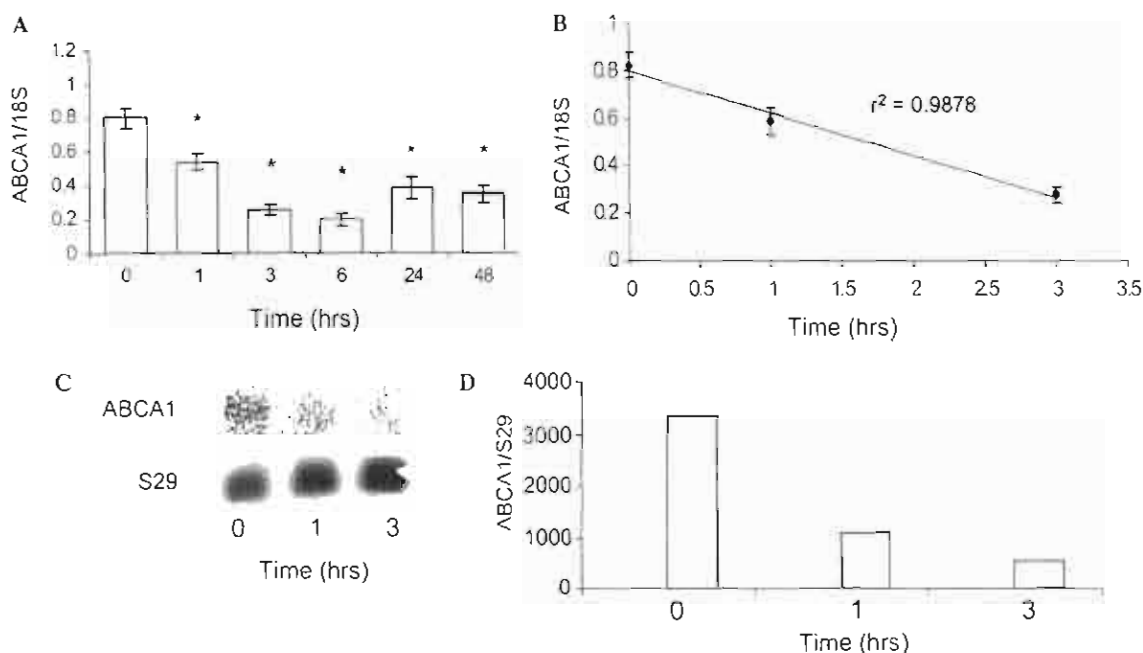


Fig. 1. Kinetics of ABCA1 down-regulation by IFN- γ . (A) Macrophages, 10 ng/ml IFN- γ , lysed 0–48 h, and ABCA1 mRNA quantitated by RT-PCR and normalized to 18S RNA. Brackets indicate the SEM. $n = 3$. * $P < 0.05$ relative to the 0 time point by a two-way ANOVA. (B) Linear regression analysis, 0–3 h, $r^2 = 0.9878$. (C) Representative Northern blot, 0–3 h following IFN- γ . (D) Phosphorimager quantitation with S29 normalization.

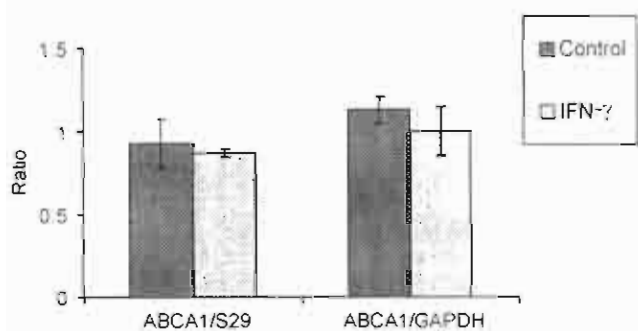


Fig. 2. IFN- γ decreases in ABCA1 mRNA are not by transcriptional regulation. Macrophages were lysed 6 h after stimulation with vehicle (control) or IFN- γ , nuclear run-ons were performed, and comparable amounts of 32 P-labeled RNA were hybridized to ABCA1, GAPDH, and S29 cDNAs. ABCA1 band intensities were quantified and expressed as a ratio to GAPDH and S29. Brackets indicate the SEM. $n = 3$.

was quantitated by RT-PCR and normalized as a ratio to 18S RNA in the same sample. As demonstrated (Fig. 3), the decrease in ABCA1 mRNA by IFN- γ was inhibited by cycloheximide. Whereas the IFN- γ treated cells demonstrated an approximate 2-fold reduction in ABCA1 mRNA, the level of ABCA1 message in IFN- γ activated macrophages co-incubated with cycloheximide was actually increased relative to the vehicle control. These results suggested that the down-regulation of ABCA1 mRNA by IFN- γ was dependent on de novo protein synthesis. Of interest was the cycloheximide control that demonstrated a clear increase in ABCA1 mRNA relative to

the vehicle control. This suggests the presence of a protein, expressed in non-induced cells, that negatively regulates the level of ABCA1 message.

The ability to inhibit the down-regulation of ABCA1 mRNA by cycloheximide suggested that IFN- γ might increase the rate of ABCA1 mRNA decay by message destabilization. In an attempt to determine whether IFN- γ induces ABCA1 message destabilization, macrophages were incubated in the presence of 5 μ g/ml of actinomycin D just prior to IFN- γ addition and at intervals between 0 and 8 h, cells were lysed, and ABCA1 mRNA and 18S RNA were quantitated by Taqman. As demonstrated (Fig. 4), both the actinomycin D treated cells and those treated with actinomycin D plus IFN- γ exhibited an exponential decay of ABCA1 mRNA. IFN- γ increased the rate of exponential decay with a $T_{1/2}$ of 115 min in the actinomycin D treated cells to 37 min in the presence of IFN- γ . These differences were apparent at both 30 and 60 min and by 90 min, the rate of decay in both groups was similar. Therefore, the rapid decrease detected in ABCA1 mRNA by IFN- γ occurs through post-transcriptional processes involving message destabilization.

Previous studies had also demonstrated that ABCA1 protein expression was reduced at 48 h following IFN- γ addition [20]. Therefore, similar studies were performed at the earlier time points to determine whether the rapid loss of ABCA1 mRNA was also associated with an equally rapid decrease in ABCA1 protein. In these studies, both primary macrophages as well as macrophage

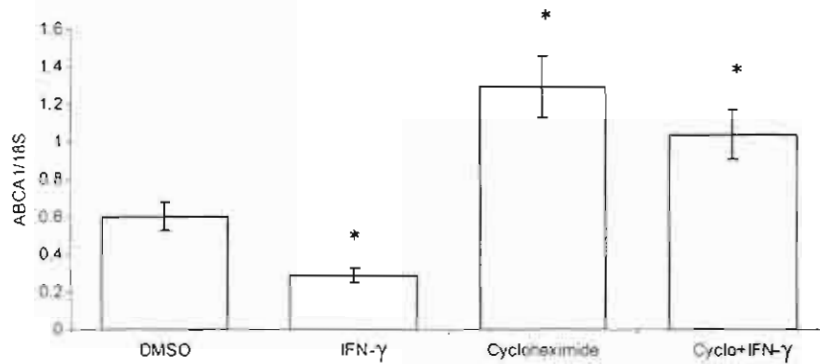


Fig. 3. IFN- γ mediated decrease in ABCA1 mRNA is dependent on de novo protein synthesis. Macrophages were stimulated with IFN- γ for 3 h with vehicle or 5 μ M cycloheximide, lysed, and mRNA quantitated by RT-PCR and normalized to 18S RNA. Brackets indicate the SEM, $n = 3$. * $P < 0.02$ relative to the DMSO control by a two-way ANOVA. P values were assessed by a Bonferroni adjustment.

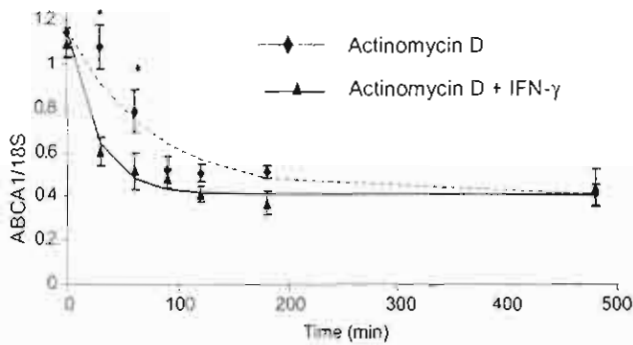


Fig. 4. IFN- γ increases the degradation rate for ABCA1 mRNA. Macrophages incubated, 5 μ g/ml actinomycin D, prior to IFN- γ or vehicle and lysed at 0–480 min. Message was quantified by RT-PCR and fitted to an exponential decay model. * $P < 0.01$ by non-linear regression analysis. $T_{1/2} = 115$ vehicle and 37 min for IFN- γ . Brackets indicate the SEM, $n = 7$.

derived foam cells were used for Western blot analysis. In both instances, the addition of IFN- γ resulted in a significant loss of ABCA1 protein at both 3 and 6 h (Fig. 5). There were no changes in the amount of HSP70 detected, which served as the normalization control. Western blots at 1 h following IFN- γ addition exhibited a trend towards a decrease in ABCA1 protein (data not shown) but the variability at this time point

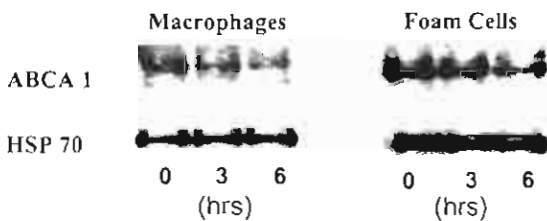


Fig. 5. Decreased ABCA1 protein in IFN- γ activated macrophages and foam cells. Macrophages and foam cells were incubated with 10 ng/ml IFN- γ and at 0, 3, and 6 h cells were lysed, electrophoresed, and nitrocellulose blots were probed with polyclonal antisera against ABCA1 and HSP 70. Representative blot, $n = 3$.

precluded any significance to this decrease. Therefore, as with ABCA1 mRNA levels, the activation of primary mouse peritoneal macrophages by IFN- γ was associated with a rapid decrease in ABCA1 protein expression.

The kinetics of ABCA1 mRNA and protein loss with IFN- γ treatment, as well as the dependence of this down-regulation on the Stat1 pathway necessitated studies to evaluate the kinetics of Stat1 phosphorylation and nuclear translocation with IFN- γ activation. Accordingly, macrophages were incubated with IFN- γ and at intervals between 0 and 45 min, nuclear and cytosolic fractions were probed with antibodies against P-Stat1, total Stat1, and an irrelevant transcription factor ATF3 on Western blots. As demonstrated (Fig. 6), IFN- γ resulted in a rapid phosphorylation of Stat1 which was detected both in the nucleus and cytosol 5 min after cytokine addition. A further increase in the amount of P-Stat1 detected in both cytosol and the nucleus was observed by 10 min with no additional increases detected at subsequent time points. In contrast to the IFN- γ -induced translocation of P-Stat1, ATF3, as a control, did not demonstrate a similar IFN- γ -induced translocation. Therefore, the kinetics of

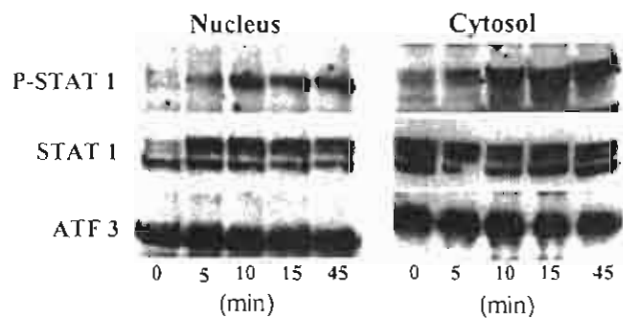


Fig. 6. Stat1 phosphorylation and nuclear translocation induced by IFN- γ . Macrophages were incubated with 10 ng/ml IFN- γ and at 0–45 min cells were lysed, and nuclear and cytosolic extracts were electrophoresed, nitrocellulose blotted, and probed with polyclonal antisera against Stat1, P-Stat1, and ATF3. Representative blot, $n = 3$.

ABCA1 message and protein degradation in IFN- γ activated macrophages were consistent with the rapid phosphorylation and translocation of P-Stat1 into the nucleus.

Discussion

IFN- γ has been demonstrated to have a negative role in cholesterol trafficking by inhibiting cellular processes associated with reverse cholesterol transport. Cholesterol esterification, for example, is increased in IFN- γ treated foam cells by increased expression of ACAT while cholesterol 27 hydroxylase, lipoprotein lipase, and apo E synthesis and secretion are decreased [10,12,24]. Scavenger receptors including SR-A and CD36 have been reported to be down-regulated in human and murine macrophages after 24–48 h incubation with IFN- γ although these same receptors are increased by IFN- γ in vascular smooth muscle cells [8,12,25–27]. IFN- γ has also been demonstrated to down-regulate other lipoprotein receptors on macrophages *in vitro* including the LDL receptor related protein, LRP [28,29], the VLDL receptor [30], and by inhibiting ligand-induced recycling of the Lpa(a)/apo(a) receptor [31].

Previous studies from this laboratory have reported that IFN- γ decreases cholesterol efflux, at least in part by its inhibitory effects on ABCA-1 expression in murine macrophages and macrophage derived foam cells [14]. ABCA1 down-regulation was dependent on Stat1 signaling since similar effects were not observed in macrophages from Stat1 KO mice [22]. These effects were apparent in macrophages stimulated with IFN- γ for 48 h. In the present study, both the kinetics as well as the mechanism for this down-regulation were explored. Significant decreases in ABCA1 message were detected 1 h following IFN- γ addition and down-regulation was dependent on *de novo* protein synthesis. This rapid decrease in ABCA1 expression was related to post-transcriptional regulation and involved ABCA1 message destabilization. These effects were also demonstrable at the protein level with decreased ABCA1 protein detected by 3 h. The mechanism involved in this IFN- γ mediated decrease in ABCA1 protein remains unknown. Preliminary studies using lysosomal inhibitors including NH₄Cl and chloroquine and the proteasome inhibitors lactacystin and epoxomicin did not inhibit the IFN- γ -induced decrease in ABCA1 protein although in the latter studies, total ubiquitinated protein detected by Western blots was significantly increased (data not shown). In contrast to these results, decreases in ABCA1 protein induced by free cholesterol and unsaturated fatty acids occur through a proteasome dependent pathway [32,33]. ABCA1 protein degradation in the absence of inflammatory stimuli has also been reported to involve calpain recognition of a conserved PEST (proline, glutamic acid,

serine, and threonine) sequence [34]. The inability in the present study to inhibit IFN- γ mediated decreases in ABCA1 protein expression with proteasome inhibitors suggests that IFN- γ -induced ABCA1 protein degradation occurs by a proteasome independent pathway.

IFN- γ has also been demonstrated to down-regulate additional membrane receptors not directly involved in lipoprotein trafficking by post-transcriptional mechanisms with kinetics similar to those observed in the present study for ABCA1. Chemokine receptors including CCR2 on monocyte/macrophages [35,36], and CXCR4 on monocytes and endothelial cells [36,37] represent examples of genes for which AU rich element (ARE) are present within the 3' untranslated region of the mRNA and are rapidly down-regulated by IFN- γ . Similar kinetics of message down-regulation by IFN- γ has also been observed in macrophage expression of the proto-oncogene *c-fos* as well as the KC/GRO chemokine [38,39]. The down-regulation of *c-fos* in phorbol ester stimulated murine peritoneal macrophages was detected by 1 h and actinomycin D experiments demonstrated a faster decay rate following IFN- γ addition. However, whereas *c-fos* also has an ARE destabilization sequence, a similar sequence is not present in ABCA1.

Down-regulation of ABCA1 expression is not limited to IFN- γ . LPS stimulation of the RAW264.7 murine macrophage cell line has also been reported to reduce ABCA1 message [21]. These effects were observed by 6 h and whether message destabilization was involved remains to be determined. ABCA1 decreases have also been observed by stimuli not directly associated with inflammatory responses. The THP-1 human monocytic leukemic cell line, for example, had a 40% reduction in ABCA1 message by 3.5 h and maximal reduction detected by 16 h when incubated with the mevalonate metabolite geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP). These effects of GGPP appear to occur by antagonizing LXR without changing LXR levels [40]. Unsaturated fatty acids and the ketone acetoacetate have been demonstrated to reduce ABCA1 message and protein expression both in HepG2 and RAW264.7 cell lines [41]. Transcriptional regulation, in this study, was demonstrated in RAW264.7 cells transfected with a 968 base pair human ABCA1 promoter-luciferase construct and stimulated with 22-hydroxycholesterol and 9-*cis*-retinoic acid. Luciferase activity in the stimulated cells was reduced 50% and 80%, respectively, by linoleic acid and acetoacetate. Transcriptional down-regulation of ABCA1 has also been reported in HepG2 cells and RAW264.7 cells when transfected with the zinc finger transcription factor ZNF202m1 [42]. Finally, ABCA1 down-regulation has also been reported in murine peritoneal macrophages, the RAW264.7 cell line, and in THP-1 as well as primary human macrophages by *in vitro* treatment with HMG CoA reductase inhibitors [43,44]. ABCA1 mRNA was reduced at 3 h and was

maximally inhibited by 12 h with fluvastatin, an effect reversible by exogenous L-mevalonate [43]. The magnitude of ABCA1 message reduction was greater than expected for the modest reduction in ABCA1 promoter activity. Additional studies suggested that part of the statin effect on ABCA1 was by inhibiting the synthesis of the oxysterol ligand 24(S),25-epoxycholesterol and hence compromising the LXR stimulation of ABCA1 transcription [44]. Therefore, depending on the nature of the stimulus, ABCA1 down-regulation by inflammatory and non-inflammatory stimuli is likely to involve both transcriptional and post-transcriptional regulation.

In summary, the current studies demonstrate that IFN- γ mediates the down-regulation of ABCA1 with kinetics consistent with the Stat1 dependence for this process. Down-regulation of ABCA1 mRNA is through a protein synthesis dependent, post-transcriptional process and is consistent with the more general effect of IFN- γ on down-regulating macrophage receptors involved in cholesterol trafficking. Clearly, the kinetics for ABCA1 message and protein reduction by IFN- γ necessitates a different perspective on ABCA1 regulation, as a true "early response" gene to IFN- γ and presumably to other inflammatory mediators.

Acknowledgment

M. Alfaro Leon wishes to acknowledge Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexico, for pre-doctoral fellowship support.

References

- [1] R. Ross, Atherosclerosis: an inflammatory disease, *N. Engl. J. Med.* 340 (1999) 115–126.
- [2] G.K. Hansson, P. Libby, U. Schoenbeck, Z.Q. Yan, Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis, *Circ. Res.* 91 (2002) 281–291.
- [3] G.S. Getz, Immune function in atherogenesis, *J. Lipid Res.* 46 (2005) 1–10.
- [4] G.K. Hansson, L. Jonasson, J. Holm, M.M. Clowes, A.W. Clowes, Gamma-interferon regulates vascular smooth muscle proliferation and Ia antigen expression in vivo and in vitro, *Circ. Res.* 63 (1988) 712–719.
- [5] W.S. Shin, Y.H. Hong, H.B. Peng, R. De Caterina, P. Libby, J.K. Liao, Nitric oxide attenuates vascular smooth muscle cell activation by interferon- γ , *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 11317–11324.
- [6] M. Sata, T. Suhara, K. Walsh, Vascular endothelial cells and smooth muscle cells differ in expression of Fas and Fas ligand and in sensitivity to Fas ligand-induced cell death: implication for vascular disease and therapy, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20 (2000) 309–316.
- [7] F. Mach, U. Schoenbeck, G.K. Sukhova, T. Bourcier, J.Y. Bonnefoy, J.S. Pober, P. Libby, Functional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for CD40-CD40 ligand signaling in atherosclerosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 1931–1936.
- [8] D. Wagsater, P.S. Olofsson, L. Norgren, B. Stenberg, A. Sirsjo, The chemokine and scavenger receptor CXCL16/SR-PSOX is expressed in human vascular smooth muscle cells and is induced by interferon gamma, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 325 (2004) 1187–1193.
- [9] D.M. Wuttge, X. Zhou, Y. Sheikine, D. Wagsater, V. Stemme, U. Hedin, S. Stemme, G.K. Hansson, A. Sirsjo, CXCL16/SR-PSOX is an interferon gamma-regulated chemokine and scavenger receptor expressed in atherosclerotic lesions, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24 (2004) 750–755.
- [10] B. Korbinian, N. Mackman, L.K. Curtis, Interferon- γ inhibits macrophage apolipoprotein E production by posttranscriptional mechanisms, *J. Clin. Invest.* 91 (1993) 2031–2039.
- [11] J.B. Yang, Z.J. Duan, W. Yao, O. Lee, L. Yang, X.Y. Yang, X. Sun, C.C.Y. Chang, T.Y. Chang, B.L. Li, Synergistic transcriptional activation of human acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase-1 gene by interferon- γ and all-*trans*-retinoic acid THP-1 cells, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 20989–20998.
- [12] C.G. Panousis, S.H. Zuckerman, Regulation of cholesterol distribution in macrophage-derived foam cells by interferon- γ , *J. Lipid Res.* 42 (2000) 75–83.
- [13] Y.J. Geng, G.K. Hansson, Interferon- γ inhibits scavenger receptor expression and foam cell formation in human monocyte-derived macrophages, *J. Clin. Invest.* 89 (1992) 1322–1334.
- [14] C.G. Panousis, S.H. Zuckerman, Interferon- γ induces down regulation of Tangier disease gene (ATP-binding cassette transporter 1) in macrophage-derived foam cells, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20 (2000) 1565–1571.
- [15] M. Bodzioch, E. Orso, J. Klucken, T. Langman, A. Botcher, W. Diederich, W. Drobnik, S. Barlage, C. Buchler, M. Porsch-Ozcurumez, W.E. Kaminski, H.W. Hahmann, K. Oette, G. Rothe, C. Aslanidis, K.J. Lackner, G. Schmitz, The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease, *Nat. Genet.* 22 (1999) 347–351.
- [16] S. Rust, M. Rosier, H. Funke, J. Real, Z. Amoura, J.C. Piette, J.F. Deleuze, H.B. Brewer, N. Duvenger, P. Denefle, G. Assman, Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1, *Nat. Genet.* 22 (1999) 352–355.
- [17] R.J. Aiello, D. Brees, O.L. Francone, ABCA1-deficient mice. Insights into the role of monocyte lipid efflux in HDL formation and inflammation, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23 (2003) 972–980.
- [18] P. Costet, Y. Luo, N. Wang, A.R. Tall, Sterol dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 28240–28245.
- [19] B.M. Hokland, J.P. Slotte, T.F. Johnson, Cyclic AMP stimulates efflux of intracellular sterol from cholesterol-loaded cells, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 25343–25349.
- [20] C.G. Panousis, G. Evans, S.H. Zuckerman, TGF- β increases cholesterol efflux and ABC-1 expression in macrophage-derived foam cells: opposing the effects of IFN- γ , *J. Lipid Res.* 42 (2001) 856–863.
- [21] I. Baranova, T. Vishnyakova, A. Bocharov, Z. Chen, A.R. Tall, J. Stonik, T. Eggerman, A. Patterson, Lipopolysaccharide down regulates both scavenger receptor BI and ATP binding cassette transporter A1 in RAW cells, *Infect. Immun.* 70 (2002) 2995–3003.
- [22] X.Q. Wang, C.G. Panousis, M.L. Alfaro, G.F. Evans, S.H. Zuckerman, Interferon- γ mediated downregulation of cholesterol efflux and ABC1 expression is by the Stat1 pathway, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22 (2002) e5–e9.
- [23] D.M. Bates, D.G. Watts, *Nonlinear Regression Analysis and Its Application*, Wiley, New York, 1988.
- [24] B. Garner, A. Baoutina, R.T. Dean, W. Jessup, Regulation of serum-induced lipid accumulation in human monocyte-derived macrophages by IFN- γ . Correlations with apolipoprotein E production, lipoprotein lipase activity and LDL receptor-related protein expression, *Atherosclerosis* 128 (1997) 47–58.

- [25] T. Nakagawa, S. Nozaki, M. Nishida, J.M. Yakub, Y. Tomiyama, A. Nakata, K. Matsumoto, T. Funahashi, K. Kameda-Takemura, Y. Kurata, S. Yamashita, Y. Matsuzawa, Oxidized LDL increases and interferon- γ decreases expression of CD36 in human monocyte-derived macrophages, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18 (1998) 1350–1357.
- [26] Y.J. Geng, J. Holm, S. Nygren, M. Bruzelius, S. Stemme, G.K. Hansson, Expression of the macrophage scavenger receptor in atherosclerosis. Relationship to immune activation and T-cell cytokine interferon- γ , *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15 (1995) 1995–2002.
- [27] H. Li, M.W. Freeman, P. Libby, Regulation of smooth muscle cell scavenger receptor expression in vivo by atherogenic diets and in vitro by cytokines, *J. Clin. Invest.* 95 (1995) 122–133.
- [28] I.M. Hussaini, J. LaMarre, J. Lysiak, L.R. Karns, S.R. Vandenberg, S.L. Gonias, Transcriptional regulation of LDL receptor-related protein by IFN- γ and the antagonistic activity of TGF- β 1 in the RAW 264.7 macrophage-like cell line, *J. Leukoc. Biol.* 59 (1996) 733–739.
- [29] J. LaMarre, B. Wolf, E.L. Kittler, P.J. Quesenberry, S.L. Gonias, Regulation of macrophages α 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein by lipopolysaccharide and interferon-gamma, *J. Clin. Invest.* 91 (1993) 1219–1224.
- [30] S. Kosaka, S. Takahashi, K. Masamura, H. Kanehara, J. Sakai, G. Tohda, E. Okada, K. Oida, T. Iwasaki, H. Hattori, T. Kodama, T. Yamamoto, I. Miyamori, Evidence of macrophage foam cell formation by very low-density lipoprotein receptor interferon-(gamma) inhibition of very low-density lipoprotein receptor expression and foam cell formation in macrophages, *Circulation* 103 (2001) 1142–1147.
- [31] P.J. Skiba, G.A. Keesler, I. Tabas, Interferon-gamma down-regulates the lipoprotein (a)/apoprotein (a) receptor activity on macrophage foam cells. Evidence for disruption of ligand-induced receptor recycling by interferon-gamma, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 23059–23067.
- [32] B. Feng, I. Tabas, ABCA1-mediated cholesterol efflux is defective in free cholesterol-loaded macrophages. Mechanism involves enhanced ABC1 degradation in a process requiring full NPC1 activity, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 43271–43280.
- [33] Y. Wang, J. Oram, Unsaturated fatty acids inhibit cholesterol efflux from macrophages by increasing degradation of ATP-binding cassette transporter A1, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 5692–5697.
- [34] N. Wang, W. Chen, P. Linsel-Nitschke, L.O. Martínez, B. Agerholm-Larsen, D.L. Silver, A.R. Tall, A PEST sequence in ABC1 regulates degradation by calpain protease and stabilization of ABC1 by apoA-I, *J. Clin. Invest.* 111 (2003) 99–107.
- [35] R.K. Tangirala, K. Muraio, O. Quehenberger, Regulation of expression of the human monocyte chemotactic protein-1 receptor (hCCR2) by cytokines, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 8050–8056.
- [36] G. Penton-Rol, N. Polentarutti, W. Luini, A. Borsatti, R. Mancinelli, A. Sica, S. Sozzani, A. Mantovani, Selective inhibition of expression of the chemokine receptor CCR2 in human monocytes by IFN- γ , *J. Immunol.* 160 (1998) 3869–3873.
- [37] S.K. Gupta, P.G. Lysko, K. Pillarisetti, E. Ohlstein, J.M. Stadel, Chemokine receptors in human endothelial cells. Functional expression of CXCR4 and its transcriptional regulation by inflammatory cytokines, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 4282–4287.
- [38] D. Radzioch, L. Varesio, c-fos mRNA expression in macrophages is downregulated by interferon- γ at the posttranscriptional level, *Mol. Cell. Biol.* 11 (1991) 2718–2722.
- [39] Y. Ohmori, T.A. Hamilton, IFN-gamma selectively inhibits lipopolysaccharide-inducible JE/monocyte chemoattractant protein-1 and KC/GRO/ melanoma growth-stimulating activity gene expression in mouse peritoneal macrophages, *J. Immunol.* 153 (1994) 2204–2212.
- [40] X. Gan, R. Kaplan, J.G. Menke, K. MacNaul, Y. Chen, C. Sparrow, G. Zhou, S.D. Wright, T.Q. Cai, Dual mechanisms of ABC1 regulation by geranylgeranyl pyrophosphate, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 48702–48708.
- [41] Y. Uehara, T. Engel, Z. Li, C. Goepfert, S. Rust, X. Zhou, C. Langer, C. Schachtrup, J. Wiekowski, S. Lorkowski, G. Assmann, A. von Eckardstein, Polyunsaturated fatty acids and acetoacetate downregulate the expression of the ATP-binding cassette transporter A1, *Diabetes* 51 (2002) 2922–2928.
- [42] M. Porsch-Özcürümez, T. Langmann, S. Heimerl, H. Borsukova, W.E. Kaminski, W. Drobnik, C. Honer, C. Schumacher, G. Schmitz, The zinc finger protein 202 (ZNF202) is a transcriptional repressor of ATP binding cassette transporter A1 (ABCA1) and ABCG1 gene expression and a modulator of cellular lipid efflux, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 12427–12433.
- [43] H. Sone, H. Shimano, M. Shu, M. Nakakuki, A. Takahashi, M. Sakai, Y. Sakamoto, T. Yokoo, K. Matsuzaka, H. Okazaki, Y. Nakagawa, K.T. Iida, H. Suzuki, H. Toyoshima, S. Horiuchi, N. Yamada, Statins downregulate ATP-binding-cassette transporter A1 gene expression in macrophages, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 316 (2004) 790–794.
- [44] J. Wong, C.M. Quinn, A.J. Brown, Statins inhibit synthesis of an oxysterol ligand for the liver X receptor in human macrophages with consequences for cholesterol flux, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24 (2004) 2365–2371.

Review

Gamma interferon: a central mediator in atherosclerosis

M. L. Alfaro Leon¹ and S. H. Zuckerman^{2,3}

¹ Universidad Autonoma Metropolitana-Xochimilco, Ciencias Biologicas Ph. D. Program, Mexico

² Lilly Research Laboratories, Eli Lilly & Co., Lilly Corporate Center, Indianapolis, IN 46285, USA, Fax: ++317 433 2815, e-mail: Zuckerman_Sтивен@Lilly.com

Received 4 May 2005; returned for revision 5 July 2005; accepted by M. Parnham 8 July 2005

Abstract. Atherosclerosis is a chronic inflammatory disease of the vasculature with lesions developing in the arterial wall, frequently in the coronary and carotid arteries. The interaction between macrophages and lymphocytes within the atherosclerotic lesion microenvironment exemplifies a site where both innate and adaptive immunity contribute towards disease progression. As gamma interferon (IFN- γ), the classic macrophage activating factor, has been localized to atherosclerotic lesions, this review will focus on its contribution to plaque pathology and will finally consider how current therapies, as exemplified by HMG CoA reductase inhibitors or statins, may impact this process beyond lipid lowering, in part by inhibiting IFN- γ dependent processes. IFN- γ sources within the atheroma as well as receptors, signaling pathways and its effects on macrophages as well as on vascular smooth muscle and endothelial cells will be considered. Therapeutic interventions targeting molecular events associated with IFN- γ signaling offer novel approaches to the treatment of atherosclerosis.

Introduction

The atherosclerotic plaque represents a lesion that initiates early in life with monocyte infiltration across the luminal endothelium into the intima of the artery in response to lipid and non-lipid mediators. Foam cell formation, both macrophage and smooth muscle cell (SMC) derived, matrix deposition, endothelial cell damage, cholesterol clefts, cellular necrosis and lesional calcification can be observed with lesion progression [1–6]. In advanced lesions, mural thrombi may be observed. Atherosclerotic lesions frequently localize to arterial sites characterized by areas of turbulent blood flow [7, 8], usually at the sites of bifurcations and curvatures resulting in decreased shear stress. The earliest lesion, the fatty

streak is characterized by macrophage and macrophage derived foam cells, as well as T cells and monocytes that have infiltrated across the endothelial layer due to cell surface changes associated with activation and resulting in leukocyte adhesion. Increases in cell adhesion proteins as well as the release of chemokines promote mononuclear cell infiltration. Migration of the SMC from the media across the internal elastic lamina and into the intima also occurs during the earliest phases of the lesion and results in intimal thickening, SMC derived foam cells and proliferation. As this process continues the chronicity and exacerbation of the developing pathology is associated with macrophage and T cell activation resulting in the elaboration of a multitude of mediators including growth factors, monokines, thromboxanes, tissue factor, colony stimulating factors, chemokines, and IFN- γ [9–12]. The presence of oxidized low density lipoproteins (LDL) further contributes to foam cells, both macrophage and SMC derived resulting in increased lipid retention and the formation of necrotic lipid cores [13, 14]. The progression of the fatty streak to an intermediate and advanced lesion is characterized by the presence of a fibrous cap. Advanced lesions can become unstable and rupture due to a thinning or erosion of the fibrous cap. Erosion of the fibrous cap is often associated with macrophages at the shoulder of the cap, which can release matrix metalloproteases (MMPs) contributing to plaque rupture, mural thrombosis and clinically relevant events.

The progression of the atherosclerotic plaque is characterized by an increasingly complex pathology, associated both with macrophage, T cell, endothelial and SMC activation, significant cytokine elaboration and increased production of proteases and oxidized lipids, all of which contributes to a chronic inflammatory state. An understanding of the central role of IFN- γ in the pathology of the atherosclerotic plaque will serve as the focus of this review. However, a brief consideration of IFN- γ receptors and signaling is in order to understand how IFN- γ can contribute to plaque progression.

Correspondence to: S. H. Zuckerman

I. IFN- γ signaling

A. Cellular sources

IFN- γ , the classic macrophage-activating factor produced by lymphocytes enabling macrophage tumoricidal activity has been the subject of numerous reviews [15–18]. In addition to CD4 positive T helper cell type 1 (Th1) lymphocytes [19], other cell types reported to secrete IFN- γ include cytotoxic CD8+ lymphocytes [20], activated macrophages [21], natural killer (NK) cells [22], B cells [23], and vascular SMC [24]. However, within the context of the atherosclerotic plaque it is likely that Th1 lymphocytes are the predominant source of IFN- γ . T cells have been reported to constitute between 10–20% of the cell population in advanced human plaques and accumulate at sites where plaque rupture and thrombosis can occur [3, 25–28]. Expression of IFN- γ in atherosclerotic lesions from both clinical samples as well as in preclinical rodent atherosclerosis models has been demonstrated [25–28]. The proximity of macrophages with Th1 cells and the elaboration of IL-12 and IL-18 by macrophages which can increase IFN- γ production [21, 29] as well as the potential for SMC derived IFN- γ [24] insures multiple cellular sources for IFN- γ within the atherosclerotic plaque.

B. Receptors and signaling pathways

IFN- γ mediated cellular signaling involves binding of the IFN- γ homodimer to the IFN- γ receptor complex [30] and has been recently reviewed [17, 18]. The receptor, a member of the class II cytokine receptor family consists of two 90-kDa ligand binding chains, IFN- γ R1 associated with two 85-kDa non-ligand binding, signal transducing chains IFN- γ R2. The receptor complex is assembled on the cellular surface and does not require ligand binding for R1 and R2 association [31]. Neither receptor chain has intrinsic kinase activity and signal transduction involves binding motifs on the intracellular domain of the R1 chain for Janus tyrosine kinase (Jak)1 [32] and for signal transducer and activator of transcription (Stat)1. The R2 chain has an intracellular motif for Jak2 kinase binding. With IFN- γ binding to the receptor complex, Jak2 is auto-phosphorylated and P-Jak2 then trans-phosphorylates Jak1 [33]. P-Jak1 will then phosphorylate critical tyrosine residues on RJ (residue 440) that allows a binding site for the SH2 domain of Stat1 [34, 35]. The associated Stat1 dimer with the R1 chains results in its phosphorylation (tyrosine 701), likely through activated Jak2 [33]. Additional phosphorylation of Stat1 through phosphatidylinositol 3-kinase-AKT pathway on serine 727 has also been observed and contributes to Stat1 dependent gene transcription [36]. The P-Stat1 dimer then dissociates from the receptor complex translocates to the nucleus and binds to IFN- γ activation sequences (GAS) on relevant gene promoters [15, 18].

In addition to Stat1 binding sites on IFN- γ inducible promoters, IFN- γ signaling involves other transcriptional activating factors with distinct DNA binding sites. Amongst these trans-activating factors, the Interferon regulatory factors (IRF) are the best characterized and bind to an IRF-E consensus site [37]. IRF-1, 8, and 9 promote transcription of a

subset of IFN- γ inducible genes whereas IRF-2 antagonizes IRF-1 inducible genes by also binding to the IRF-E consensus site [38]. IRF-1 binding to IFN- γ inducible genes occurs at a promoter site distinct from Stat1 and cooperatively between these two transcription factors results in maximal induction of IFN- γ inducible genes including gp91^{phox} subunit of NADPH oxidase [39], the class II transcription co-activator (CIITA) by binding to promoter IV [40], the transporter associated with antigen processing (TAP)-1 and low-molecular-mass protein (LMP)-2 genes also associated with antigen presentation [41]. IRF-1 itself is induced by IFN- γ and is Stat1 dependent. A further understanding of the role of IRF-1 in IFN- γ inducible gene transcription has been obtained in studies with IRF-1 knockout (KO) mice. IFN- γ induction of cyclooxygenase-2 gene transcription in macrophages was inhibited in macrophages from IRF-1 KO mice [42]. A similar result was demonstrated in the loss of IFN- γ induction of cathepsin S in bone marrow cells from IRF-1 KO mice [43]. IFN- γ inducible genes associated with feedback regulation such as Suppressors of Cytokine Signaling (SOCS)-1 also show diminished induction in embryonal fibroblasts from IRF-1 KO mice [44]. IRF-1 is also able to interact with other transcription factors beyond Stat1 to promote IFN- γ inducible gene transcription including IRF-8 in the induction of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in RAW 264.7 cells [45] and with C/EBP β to form a complex for promoter stimulation of the IL-18 binding protein [46]. Whereas Stat1 phosphorylation and nuclear translocation plays an important role in IFN- γ gene activation or repression, studies with Stat1 KO mice have revealed that IFN- γ can also activate a subset of genes through non Stat1 dependent pathways [47–49]. Mouse embryo fibroblasts from Stat1 KO mice, for example, respond to IFN- γ through Stat3 phosphorylation and will result in transcriptional activation of genes including SOCS-3, Fas, C/EBP δ [50, 51] that usually respond to IFN- γ via Stat1. Transcriptional profiling of macrophages [47] and mouse embryo fibroblasts [48] from wild type as well as Stat1 KO mice revealed a complex profile of IFN- γ regulated genes that were independent of Stat1 signaling. Genes such as macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α , MIP-1 β , monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) were induced, or as observed for CXCR4 down-regulated in both Stat1 wild type and KO macrophages. Other genes such as arginase and IL-1 β however, were induced only in Stat1 KO macrophages. Of interest was that while Stat1 independent, these gene changes were not observed in macrophages derived from Jak1 KO mice [47]. The expression of a total of 150 genes were either induced or inhibited in response to IFN- γ in the Stat1 KO macrophages. Similar studies with mouse embryo fibroblasts from wild type and Stat1 KO mice also demonstrated Stat1 independent gene regulation including transcription factors such as EGR-1 and 2, c-Jun, as well as the cytokines MIP-1 α , osteopontin, PDGF- α and MCP-1 [48, 49].

While IFN- γ signaling is well understood through the Jak-Stat pathway, IFN- γ can activate other signaling pathways including the MAP kinases, Src and ERKs [17, 49–52]. IFN- γ also activates I κ B kinase, (IKK) and in studies with mouse embryo fibroblasts from IKK alpha and beta KOs, a significant number of IFN- γ stimulated genes were no longer induced although enhanced Stat1 transcription was observed

[53]. Indeed, a cytokine as central to innate immunity as IFN- γ would likely have evolved multiple signaling pathways to insure host survival.

Negative regulation of IFN- γ signaling is mediated by induction of SOCS proteins, primarily SOCS-1 as well as by Src homology 2-domain containing protein tyrosine phosphatases (Shp) including Shp-1 and 2 [54, 55]. Both mechanisms result in an inhibition of Stat1 signaling and mouse models where either SOCS-1 or Shp-1 are deleted are characterized by severe systemic inflammatory responses [56, 57]. SOCS-1 binds to and inhibits Jak2 kinase activity [58] and might also serve to target Jak2 for proteasomal degradation [59, 60]. SOCS-1 may interact directly with Jak2 after docking with the IFN- γ R1 subunit as mutation of tyrosine 441 on the IFN- γ R1 chain blocked the ability of SOCS-1 to bind to the R1-Jak2 complex and inhibit Stat1 activation [61]. Clearly, the rapid induction of SOCS-1 by IFN- γ would serve as a tightly linked negative feedback mechanism to limit IFN- γ induced cellular activation.

The role of protein tyrosine phosphatases in inhibiting IFN- γ signal transduction has also been reported. Shp-2, for example, has been demonstrated to bind directly to IFN- γ R1 and inhibit Stat1 activation [62]. While it appeared in this study that Shp-2 did not directly modulate the level of tyrosine phosphorylation of IFN- γ R1, the level of Jak1 phosphorylation was increased in Shp-2 negative cells. In addition, a distinct mechanism that may contribute to inhibiting Stat1 signaling is the protein inhibitor of Stat1 (PIAS-1), which directly binds to Stat1 and inhibits the association of the Stat1 dimer with DNA [63]. Therefore, both induction of SOCS protein expression and inhibiting Stat1 phosphorylation represent feedback mechanisms to inhibit expression of a subset of IFN- γ inducible genes. Whereas IFN- γ induces SOCS-1, 2, and 3 gene expression, it appears that SOCS-1 is a more potent inhibitor of Stat1 signaling than SOCS-3 with SOCS-2 not having any effect on IFN- γ induced Stat1 phosphorylation [64, 65].

Inhibition of IFN- γ signaling by cytokines associated with Th2 cells including IL-4 and IL-10 also represents a mechanism to limit the inflammatory process. IL-10 treatment of human peripheral blood monocytes prior to IFN- γ stimulation, for example, inhibited the induction of ICAM-1 and the chemokine inducible protein-10 (IP-10) while not inhibiting the IFN- γ induction of IRF-1 [66]. These effects occurred both by inhibiting Stat1 phosphorylation as well as by inducing SOCS-3 expression.

The relative contributions of SOCS-1, SOCS-3, Shp-1, Shp-2 and PIAS-1 in inhibiting IFN- γ mediated atherosclerotic lesion progression within the microenvironment of the plaque remains unclear and will likely be determined by the relative balance between pro and anti-inflammatory cytokines. Finally, while IFN- γ signaling is through its interaction with high affinity receptors, IFN- γ can also bind, with lower affinity, to chondroitin sulfate proteoglycans in general and CD44 in specific on human vascular SMC [67, 68]. This interaction although not unique to IFN- γ could serve as a mechanism within the atherosclerotic lesion to both retain and position IFN- γ to bind to the higher affinity receptor complex and also possibly allowing higher cellular levels of IFN- γ within the lesion than would be expected in the fluid phase. The interplay between both high affinity receptors

and lower affinity proteoglycan interactions, coupled with Stat1 dependent and independent signaling offers a potential for specificity within the lesion microenvironment for the cellular responses to IFN- γ .

II. IFN- γ effects at the cellular level

The number of genes regulated by IFN- γ through Stat1 dependent or independent pathways is in excess of 500 [15]. In reviewing the *in vitro* effects of IFN- γ on gene expression in endothelial cells, macrophages and SMC, as the key non-lymphoid cellular components of the atherosclerotic plaque, there are clear examples of both IFN- γ mediated decreases (Table 1) and increases (Table 2) in gene expression with direct relevance to plaque homeostasis. The spectrum of genes regulated by IFN- γ includes cell surface markers and receptors, proteases, matrix proteins, secreted mediators, lipases, oxidases as well as intracellular enzymes and transcription factors. These changes in gene expression will be considered as two functional classes, namely those associated with direct effects on cholesterol or lipid trafficking within the atherosclerotic lesion and those more directly associated with non-lipid, inflammatory processes. It should be noted however, that this classification is artificial with clear examples of gene changes such as those observed for scavenger receptors that in addition to effecting the uptake of modified LDL will also serve as receptors for other ligands including apoptotic cells and in the case of the scavenger receptor that binds phosphatidylserine and oxidized lipoprotein (SR-PSOX), also is the chemokine CXCL16 [69, 70].

A. IFN- γ effects on cholesterol and lipid trafficking

IFN- γ down-regulates receptors involved in the uptake of modified LDL particles as well as receptors involved in reverse cholesterol transport (Table 1). Scavenger receptors including SR-A and CD36 are decreased in macrophages by *in vitro* treatment with IFN- γ [71–74]. The reductions in both CD36 protein and message were reported for human monocyte derived macrophages as well as murine peritoneal macrophages. As these receptors are not down regulated by exogenous cholesterol the results would suggest that IFN- γ should reduce foam cell formation by reducing scavenger receptor expression and hence the overall number of foam cells within the atherosclerotic plaque. However, in contrast to the effects of IFN- γ on down-regulating SR-A and CD36, a potential IFN- γ activation site has been reported in the SR-A promoter [74] and SR-A has been reported to be up-regulated by IFN- γ in human monocyte and vascular SMC cultures [69, 74, 75]. Therefore, it is possible that IFN- γ may, based on modulation of scavenger receptors, increase the amount of SMC derived foam cells at the expense of macrophage derived foam cells.

In contrast to the down-regulation of scavenger receptors SR-A and CD36, IFN- γ increased the expression of SR-PSOX in human monocytes and in THP-1 cells, both at the protein and mRNA levels [70]. A similar effect was observed in IFN- γ treated apolipoprotein (apo) E KO mice where increased macrophage expression of SR-PSOX was detected

Gene	Cell type	Reference	Table 1. Atherosclerosis relevant genes down-regulated by IFN- γ
ABCA1	Mouse macrophages	[82]	
Apo E	Mouse and human macrophages	[78, 85, 86]	
Cholesterol 27-hydroxylase	THP-1 cell line, human endothelial cells	[81, 87]	
CD36	Mouse, human macrophages	[72, 73]	
VLDL receptor	THP-1	[79]	
Lipoprotein lipase	Human macrophages	[78, 84]	
LDL-receptor-related protein	Human macrophages, RAW cell line	[76–78]	
Lp[a]/apo[a]	Mouse, human macrophages	[80]	
Lysyl oxidase	Rat aortic SMC	[128]	
Collagen type VIII	Human macrophages	[147]	
α -actin	Human SMC	[129]	
Collagens I & III	Human SMC	[127]	
AT-1a receptor	Rat SMC	[123]	
MMP-9	TNF induced human macrophages	[143]	
15-LO	IL-4 induced human monocytes	[156]	
c-myc	Rat SMC	[124]	
BLT1	Human monocytes	[151]	
CCR2	Human monocytes, THP-1	[151–153]	
CXCR4	Human monocytes, endothelial cells.	[153, 155]	
E and P selectins	Cytokine induced human endothelial cells	[105]	
Cathepsin L	Murine macrophages	[142]	
SR-A	Human macrophages	[71, 74]	
PECAM-1	Human, bovine endothelial cells	[106]	

in macrophages localized to atherosclerotic lesions [70]. Similar to the effects on macrophages, IFN- γ also increased SR-PSOX mRNA and protein expression in human aortic SMC [69]. Up-regulation of this scavenger receptor would provide a mechanism for the continued uptake of oxidized LDL by macrophages while other scavenger receptors were down regulated by IFN- γ .

IFN- γ also down regulates other lipoprotein receptors on macrophages in vitro that could impact foam cell formation. Specifically, the LDL receptor (LDLR) related protein was decreased in both murine macrophage cell lines and human macrophages by IFN- γ [76–78]. Similar IFN- γ effects were observed for the VLDL receptor in phorbol ester stimulated THP-1 and HL60 human macrophage cell lines and in macrophage derived foam cells, but not in human monocytes [79]. In a distinct process, IFN- γ reduces Lp(a)/apo(a) receptor expression by inhibiting ligand-induced receptor recycling [80]. IFN- γ also decreases cholesterol efflux and ABCA1 expression in murine macrophages and macrophage derived foam cells and cholesterol efflux in THP-1 cells [81, 82]. This effect on murine macrophages was dependent on Stat1 signaling as IFN- γ induced down-regulation of ABCA1 was not observed in macrophages from Stat1 KO mice while IFN- γ induced IL-6 secretion remained intact [83]. Therefore, many receptors involved in cholesterol trafficking within the foam cell are down regulated by IFN- γ in macrophages although there can be different outcomes when evaluating these same receptors on vascular SMC.

IFN- γ also decreases macrophage synthesis of lipoprotein lipase (LPL) [78, 84], apo E [78, 85, 86] macrophage and human aortic endothelial cell synthesis of cholesterol 27-hydroxylase [81, 87] and yet increases the synthesis of acyl-CoA: cholesterol-O-acyltransferase (ACAT) [73, 88] and the secretion of group IIA secretory phospholipase A₂, (s-PLA₂), by macrophages and human arterial SMC [89, 90]. The decreased synthesis and secretion of LPL and apo E could result in reduced LDL and VLDL clearance from the circulation or lesion while the increased secretion of s-PLA₂ could contribute to LDL modification and divert clearance of these particles from the LDLR to scavenger receptors. The decreased synthesis of 27-hydroxylase could reduce clearance of cholesterol from foam cells as 27-hydroxylation represents the first step in extrahepatic cholesterol metabolism [87]. Finally, IFN- γ stimulated increases in ACAT activity and expression in macrophages would be expected to promote cholesterol storage by increasing cholesterol ester content within the macrophage derived foam cell [73, 88]. The overall picture then that emerges from the effects of IFN- γ on cholesterol and lipoprotein trafficking, largely based on in vitro studies of macrophages and macrophage derived foam cells, is a disruption or inhibition of reverse cholesterol transport. It would be anticipated that the reductions in ABCA1 and cholesterol 27 hydroxylase expression with increased ACAT expression could explain the net overall reduction in cholesterol efflux in IFN- γ stimulated macrophage derived foam cells [73, 81, 82]. These effects,

Gene	Cell type	Reference
Class II antigen	SMC, endothelial cells, macrophages	[91, 93, 96]
Tissue factor	Human macrophages, endothelial cells	[117]
SR-PSOX	Human monocytes, THP-1, SMC	[69, 70]
ACAT	Human and murine macrophages	[73, 88]
ICAM-1, sICAM	Human SMC, endothelial cells [ECV304]	[132, 135, 186]
CD40	Human endothelial cells, SMC, macrophages	[112–114]
CD40 ligand	Human endothelial cells, SMC, macrophages	[112]
HMGB1	Human monocytes, THP-1	[149]
sPLA ₂ Group IIA	Human aortic SMC	[89, 90]
Fas	Human endothelial cells	[116]
MMP-1	Human macrophages	[143, 147]
VCAM-1	Human SMC	[136]
iNOS	Murine macrophages	[15, 16, 45]
$\alpha 5\beta 1$ integrin	Human vascular SMC	[134]
2,5'Oligoadenylate synthetase	Human vascular SMC	[121]
IL-1sR α	IL-1 β or TNF α stimulated human endothelial, SMC	[24]
Fractalkine	IL-1 β or TNF α stimulated human endothelial, SMC.	[108, 131]
GTP-cyclohydrolase I, tetrahydrobiopterin	TNF stimulated human endothelial cells	[118]
IP-10, MIG, I-TAC	Human endothelial, macrophages, SMC	[109]
Indoleamine 2,3-dioxygenase	Human SMC	[140, 141]
Cathepsin S	Human SMC, mouse macrophages	[142]
PDGF- β receptor	Porcine vascular SMC	[137]
SR-A	Human, rabbit vascular SMC, human monocytes	[69, 74, 75]
Gp91 ^{phox}	Human U937 macrophage cell line	[39]
MCP-1	Human macrophages, endothelial cells	[158, 159]

Table 2. Atherosclerosis relevant genes up-regulated by IFN- γ .

in addition to the down-regulation of scavenger receptors including SR-A and CD36, would likely reduce the clearance of modified lipoprotein particles generated by IFN- γ stimulated oxidases, lipases and other processes which would increase lipoprotein modification. To what extent increases in other scavenger receptors including SR-PSOX will compensate for the more general observation of scavenger receptor down-regulation within the milieu of the atherosclerotic lesion remains to be determined. Thus, in considering the effects of IFN- γ on the key cell types within the atherosclerotic lesion the overall impact would be to promote retention of cholesterol and modified lipoproteins and hence contribute towards plaque progression.

B. IFN- γ effects on gene changes associated with inflammation

In distinction to the decreases in membrane receptor expression involved in lipid trafficking, IFN- γ has a more consistent pattern of up-regulating membrane receptors and secretory products associated with inflammatory responses (Table 2). IFN- γ effects on endothelial, vascular SMC and monocyte-macrophages as well as foam cells will increase Th1 immune responses via up-regulation of class I and II

antigens and increase monocyte and lymphocyte infiltration into the vascular lesion via increases in chemokines and surface adhesion molecules. IFN- γ also increases protease expression and decreases matrix protein synthesis consistent with plaque destabilization. Specific examples of each of these effects at the cellular level are considered further.

IFN- γ has been demonstrated to increase class II antigen expression on SMC as well as in more classic immune cell types including dendritic cells, B lymphocytes and monocytes-macrophages [91–93]. IFN- γ also increases other components involved in antigen presentation including cathepsin S, TAP, and LMP proteasome subunits and thus can contribute to the progression of atherosclerosis by the recognition of autoantigens. To this extent T cells from human plaque recognizing oxidized LDL as an autoantigen [94] and antibodies against oxidized LDL have been reported in atherosclerotic patients [95]. Therefore, in the context of antigen presentation, IFN- γ expression within the atherosclerotic lesion is likely to contribute to adaptive immunity by up-regulating both class I and II antigens and other components required for antigen presentation by classic antigen presenting cells including monocyte-macrophages and dendritic cells as well as by non classic antigen presenting cells such as endothelial [96–98] and vascular SMC [91, 92]. IFN- γ effects on antigen presentation by endothelial cells include up-regulation

of both class I and class II antigens, the increased synthesis of the LMP7 proteasome subunit, and increased synthesis of the TAP-1 and TAP-2 transporters [96–101]. These *in vitro* effects provide a rationale for IFN- γ playing a role in adaptive immunity by increasing antigen presentation to the appropriate T cells by the endothelial and vascular SMC.

IFN- γ effects on endothelial cells can largely be considered in the context of promoting endothelial cell pro-inflammatory changes. Endothelial cells are highly sensitive to IFN- γ [101] and this may be related to a possible deficiency in Shp-1 expression [102]. Whereas class I antigen, TAP-1, and IRF-1 are sensitive to IFN- γ and Stat1 dependent, Stat1 activation alone, by a different cytokine, oncostatin M, failed to increase expression of these same genes [101]. These oncostatin M results suggest that Stat1 signaling is necessary but not sufficient for a subset of IFN- γ inducible genes in endothelial cells.

Cell surface changes induced by IFN- γ largely promote mononuclear cell infiltration across the endothelial layer through induction of cellular adhesion molecules including ICAM and VCAM-1 [103–105]. Interestingly, IFN- γ has also been reported to inhibit the induction of E and P selectins on human endothelial cells, an effect which could impact neutrophil recruitment [105] and by message destabilization, the constitutive expression of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) [106]. IFN- γ increases endothelial cell synthesis of chemokines including MCP-1 [107], fractalkine [108] as well as IP-10, monokine induced by IFN- γ (MIG), and IFN-inducible T-cell α -chemoattractant (I-TAC) [109]. Binding of these latter three chemokines to the CXCR3 receptor on T cells within atherosclerotic lesions further contributes to the accumulation of activated Th1 cells. Inhibiting MCP-1 signaling through CCR2 KO or enhancing signaling through MCP-1 infusion will mitigate or exacerbate lesion development respectively in apo E KO mice [110, 111].

In addition to inducing secretion of chemokines and increasing endothelial cell surface adhesion molecules, IFN- γ increases the expression of both CD40 and CD40 ligand on endothelial cells [112, 113]. The co-expression of CD40 ligand and receptor on endothelial as well as on SMC and macrophages provides additional understanding as to how IFN- γ can exacerbate an inflammatory response and promote plaque instability through activation of the CD40-CD40L axis [112–114].

Endothelial function can also be modulated by IFN- γ through the induction of additional membrane components including the IL-18 receptor, Fas antigen and tissue factor [24, 115–117]. IL-18 binding to endothelial cells via the IL-18 receptor will result in increased expression of ICAM-1 and VCAM-1 providing additional stimuli to increase mononuclear cell interactions with the endothelium [24, 115]. Fas expression on endothelial cells but not on vascular SMC has been reported to increase following IFN- γ activation [116]. While these changes in endothelial cells would be consistent with a destabilization of the atherosclerotic plaque, the effects of IFN- γ on endothelial eNOS and tetrahydrobiopterin (BH4) levels via effects on GTP cyclohydrolase I are less obvious in their pathologic implications. GTP cyclohydrolase I is the first enzyme in the *de novo* synthesis of BH4 and has been reported to be induced by IFN- γ [118, 119] with synergistic induction reported in combining IFN- γ with

TNF or IL-1 β . This is associated with increases in cellular BH4 levels and occurs through the Jak-Stat pathway. As BH4 levels are important in eNOS activity it would appear that IFN- γ could improve endothelial function by increasing GTP cyclohydrolase I, the rate limiting enzyme for BH4 synthesis. However, apo E KO mice crossed with an eNOS over-expressing transgenic under the control of the preendothelin-1 promoter had increased atherosclerotic lesions when compared to the apo E controls [120]. While eNOS was over-expressed it appeared that the over-expression resulted in eNOS dysfunction and superoxide generation. Infusion of BH4 reduced lesion size back to that observed in the apo E KO parent [120]. In summary, while the overall effect of IFN- γ on endothelial cells remains one of cellular activation and plaque destabilization by promoting procoagulant surface changes, increased adhesion molecule expression and secretion of inflammatory mediators, there are likely to be endothelial responses induced by IFN- γ that may counteract these inflammatory changes. Whether the increase in GTP cyclohydrolase I is such an example remains to be determined.

IFN- γ effects on vascular SMC are similar to those observed for endothelial cells. These effects are considered in the context of the role of the vascular SMC in matrix deposition, and as a cell that within the lesion contributes both secretory mediators and cell surface receptors involved in plaque progression. Intimal SMC proliferation and foam cell formation in atherosclerotic lesions renders this cell type a major cellular component of the atherosclerotic plaque. IFN- γ has both anti-proliferative and pro-apoptotic effects on SMC *in vitro* [91, 121, 122]. IFN- γ , for example, decreases the expression of the angiotensin type 1a receptor for angiotensin II [123], and c-myc expression in SMC [124] as well as in human fibrosarcoma cells [125] and in CSF-1 induced murine macrophage lines [126]. As angiotensin II stimulates vascular cell proliferation, the IFN- γ mediated decrease in this receptor could limit SMC proliferation.

In addition to having anti-proliferative effects, IFN- γ effects *in vitro* on SMC would be consistent with plaque destabilization by inhibiting matrix formation or increasing matrix degradation. Decreases in both basal and transforming growth factor beta (TGF β) induced synthesis of collagen types I and III have been reported in IFN- γ stimulated human vascular SMC [127]. IFN- γ also down-regulates, by both transcriptional and post-transcriptional processes, the expression of lysyl oxidase, an enzyme involved in the extracellular cross-linking of elastin and collagen in rat aortic SMC [128] as well as alpha-smooth muscle actin [129]. A decrease in matrix cross-links would be anticipated to weaken the fibrous cap of an atherosclerotic lesion. IFN- γ also increases the secretion of cathepsin S in human SMC resulting in elastin degradation [130]. Therefore IFN- γ effects on SMC would result in both a decrease in matrix synthesis and an increase in degradation through protease(s) induction.

IFN- γ also increases the secretion of chemokines including CXCL16 (SR-PSOX) [69], IP-10 [108], and fractalkine [131], as well as the secretion of sPLA₂-group IIA [89], soluble ICAM-1 [132], and the secretion of the vasoconstrictor endothelin-1, ET-1 [133], in vascular SMC. These increases in chemokines and other mediators coupled with increases in surface expression of class II antigen [91], the fibronectin re-

ceptor alpha5 beta 1 integrin [134], ICAM-1 [135], V-CAM [136], CD40L [112] and PDGF receptors [137] would be consistent with plaque progression. However, as with the in vitro endothelial studies, IFN- γ effects on vascular SMC can, in some instances, be considered vascular protective. IFN- γ , for example up-regulates extracellular superoxide dismutase as well as the expression of mitochondrial manganese superoxide dismutase [138]. Increased superoxide dismutase activity could limit tissue damage mediated by superoxide radicals. In a separate study, human vascular SMC secretion of GM-CSF and G-CSF induced by IL-1 was inhibited by IFN- γ [139]. In view of the stimulatory effects of GM-CSF on macrophage effector functions, reduced expression of GM-CSF, if demonstrable by IFN- γ in vivo, could also have a vascular protective effect. Finally, IFN- γ induces the expression of indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO) in vascular SMC [140, 141]. A link between increased IDO activity and persistence of Chlamydia pneumoniae due to reduced levels of tryptophan, as well as the continued interest in the relationship between Chlamydial infections and atherosclerotic disease offer an additional perspective as to how IFN- γ effects on vascular SMC can influence plaque progression.

IFN- γ effects on macrophages have been extensively reviewed [16, 18] and will not be covered in any depth. IFN- γ stimulatory effects on antigen presentation by macrophages include class I and class II antigen up-regulation, induction of TAP-1 and LMP2 for class I antigen processing [41] as well as induction of cathepsin S for processing the invariant chain associated with class II antigen presentation [142]. However, while increasing cathepsin S expression, other proteases including cathepsin L and MMP-9 induction were inhibited by IFN- γ [142, 143]. In contrast to the general effects of IFN- γ on promoting plaque instability, the decrease in TNF induced MMP-9 by IFN- γ would suggest a possible positive effect on plaque stability.

IFN- γ has been reported to increase the synthesis of neopterin and 7, 8 dihydroneopterin in human macrophages which can promote LDL oxidation [144]. IFN- γ , through Stat1 and IRF-1 dependent signaling can also increase macrophage mediated oxidant injury by inducing the gp91^{phox} subunit of the NADPH oxidase [39]. The ability to promote increased LDL oxidation coupled with the increase in SR-PSOX may provide a mechanism for oxidized LDL clearance within the atherosclerotic lesion [70] but this must be viewed relative to the down-regulation of other scavenger receptors by IFN- γ as previously discussed. Possibly relevant to the effects on scavenger receptors, IFN- γ inhibits the increased clearance of apoptotic cells by macrophages that are induced in vitro by glucocorticoids such as dexamethasone [145]. Whether this is through IFN- γ mediated scavenger receptor down-regulation remains to be determined.

IFN- γ has also been reported to decrease the expression of insulin like growth factor 1, (IGF-1) in IL-4 stimulated mouse macrophages through a Stat1 dependent pathway [146]. As IGF-1 is involved in types I and III collagen synthesis this would provide further examples for IFN- γ in decreasing matrix synthesis by regulating macrophage IGF-1 production. Additional studies have demonstrated that synthesis of type VIII collagen by human macrophages was reduced by IFN- γ [147] thus providing further support for the role of IFN- γ in plaque destabilization.

In distinction to the decrease in IGF-1 synthesis, IFN- γ increases expression of the ubiquitous, high mobility group box 1 (HMGB1) protein [148, 149]. HMGB1 is a non-histone chromatin associated protein that can also be detected in the cytoplasm of activated macrophages and released through a non-signal peptide dependent pathway. HMGB1 has been detected primarily in macrophages but also in endothelial cells and some intimal SMC within atherosclerotic lesions [149]. The most intense staining was observed adjacent to necrotic cores within the atherosclerotic lesions. Increased expression of HMGB1 was reported following IFN- γ treatment of THP-1 cells and primary monocytes [148, 149]. These increases in HMGB1 were inhibited in part by PI3 kinase or JAK2 kinase inhibitors or by TNF neutralization [148, 149]. HMGB1 increases NK cell production of IFN- γ when NK cells are cocultured with IL-1 or IL-12 [150]. While remaining an in vitro observation, it does suggest that within the atherosclerotic plaque IFN- γ may increase macrophage production of HMGB1 resulting in further production of IFN- γ by NK cells and possibly other cell types through a cytokine loop distinct from the more classic macrophage derived monokines.

Whereas, most of the IFN- γ effects on monocytes and macrophages are pro-inflammatory, IFN- γ down-regulates expression of the high affinity leukotriene B₄ receptor, BLT1 [151], the CCR2 receptor for MCP-1 [151–153], CXCR4 on monocytes [153, 154] and endothelial cells [155], 15-lipoxygenase expression in IL-4 stimulated monocytes [156], as well as CD163, a scavenger receptor recognizing hemoglobin-haptoglobin complexes [157]. The down-regulation of both BLT1 and CCR2 messages was detected 4 hrs after IFN- γ addition and was associated with a reduction in cell surface receptor expression. In distinction to the down-regulation of BLT1, CCR2 and CXCR4, IFN- γ did not reduce the expression of other chemokine receptors including CCR1, CCR3, CCR4, or CCR5 [153]. The reduction in surface expression of BLT1 and CCR2 resulted in a loss in the monocyte chemotactic response to LTB₄ and MCP-1 respectively. Therefore, while inducing MCP-1 in human monocytes and endothelial cells [107, 158, 159], this pro-inflammatory response elicited by IFN- γ may be blunted by CCR2 down-regulation.

Finally, the demonstration that the apo E KO mouse crossed with the BLT1 KO had reduced atherosclerotic lesions relative to the apo E KO parent [160] as well as earlier studies in the apo E KO using an LTB₄ receptor antagonist [161] would suggest a protective role of IFN- γ by down-regulating the BLT1 receptor. Similar genetic crosses between the apo E KO and the CCR2 KO also revealed reductions in atherosclerotic lesions [110, 162] suggesting that IFN- γ , by down-regulating BLT1 and CCR2 receptors, may in certain instances reduce lesion progression. However, it has not yet been determined whether IFN- γ induces a similar reduction of these receptors in vivo.

III. IFN- γ effects in preclinical cardiovascular disease models

IFN- γ in addition to its role in atherosclerotic disease has also been directly linked to other forms of cardiovascular disease (Table 3) including a detrimental role in post-transplant

Table 3. *In vivo* effects of IFN- γ in pre-clinical cardiovascular disease models.

Model	Lesion Severity	Reference
IFN- γ R KO x apo E KO	Decreased	[169]
IFN- γ KO x LDLR KO	Decreased	[170]
IFN- γ infusion into apo E KO	Increased	[171]
Cardiac allograft into IFN- γ KO	Decreased	[165, 166]
Human arterial graft-SCID mice, IFN- γ neutralized	Decreased	[163, 164]
Porcine or human graft-SCID mice, IFN- γ infusion	Increased	[137]
CaCl ₂ induced aortic aneurysm in IFN- γ KO	Decreased	[167]
Aortic allograft induced aneurysm in IFN- γ R KO	Increased	[168]

graft arteriosclerosis [137, 163–166] as well as in abdominal aortic aneurysm [167, 168]. The contribution of IFN- γ to atherosclerotic plaque progression has been demonstrated in both the apo E and LDLR KO mouse models [169, 170]. Apo E KO mice lacking the IFN- γ R for example, had a 60% reduction in lesion lipid content, an overall decrease in lesion size and cellularity, and an increase in lesion collagen [169]. In view of the effects of IFN- γ on lipid trafficking, chemokines and its negative effect on collagen synthesis (Tables 1, 2), these *in vivo* effects were consistent with the *in vitro* results. However, an increase in phospholipid/apo A-IV particles was also observed which would have an atheroprotective effect. Thus to what extent the decrease in lesions relative to the apo E KO parent was due to anti-inflammatory effects within the lesion versus systemic effects via plasma lipoprotein modulation could not be dissected. Similar reductions in lesions were also observed when LDLR KO mice were crossed with IFN- γ KO mice [170]. In this study, the absence of IFN- γ did not affect serum lipoproteins or cholesterol but did significantly reduce lesion size compared to the LDLR KO parent. There were fewer macrophages and SMC within the lesion after 8 weeks on diet but this effect was not apparent by 20 weeks. Total lesion size at the aortic arch was reduced by 75% at 8 weeks and 43% at 20 weeks. Interestingly, while class II antigen expression was significantly decreased on macrophage and SMC, class II expression on the endothelial cells remained elevated, suggesting an IFN- γ independent process for class II antigen expression on the vascular endothelium. Collectively, these loss of function studies demonstrated that disruption of the IFN- γ pathway by ablating either IFN- γ or its receptor resulted in reduced atherosclerotic lesions in these hypercholesterolemic mouse models. Conversely, infusion of IFN- γ into apo E KO mice increased aortic lesions approximately 2 fold with similar increases in the number of T lymphocytes and class II positive cells within the lesion [171]. These increases in aortic lesions occurred despite a modest reduction in serum cholesterol, thereby diminishing the effect of serum lipid changes in modulating lesion size.

Additional studies have focused on the role of IFN- γ in lesion progression when other inflammatory stimuli were

used *in vivo* to provoke lesion progression [172, 173]. Infusion of IL-18 into apo E KO mice for 30 days, for example, resulted in an increase in aortic lesion area when compared to saline controls. However, when similar experiments were performed in the combined apo E and IFN- γ knockout, the lesion area was similar between the saline and IL-18 infused animals suggesting that the exacerbation of aortic lesions via IL-18 is dependent on increased IFN- γ production [172]. Similar studies performed in apo E KO mice that were also severe combined immunodeficient (SCID) demonstrated that IL-18 increased both circulating and lesion concentrations of IFN- γ in a mouse model characterized by the absence of T cells [173]. These increases in IFN- γ were observed in macrophages, NK cells and in aortic vascular cells. Increases in aortic surface area lesion content, and in the lesion expression of CD68, VCAM-1, class II antigen and CXCL16 were also observed demonstrating that IFN- γ induced by IL-18 in the absence of T cells was sufficient to exacerbate the lesion size and inflammatory state within the lesion microenvironment.

The early effects of IFN- γ on cell surface markers have also been investigated, 18 hrs following IFN- γ infusion, in apo E or LDLR KO mice [174]. These studies demonstrated increases in class II antigen and CD80 in peritoneal macrophages from both mouse models as well as increased CD40 in apo E KO mice suggesting functional changes in plaque relevant cell types, early after IFN- γ exposure [174]. In a distinct model investigating the microvascular response in mildly hypercholesterolemic mice by intravital microscopy, increased leukocyte adhesion and emigration in cremasteric venules as well as an increased oxidative burst were observed in wild type mice in response to a high cholesterol diet [175]. In contrast, similar studies failed to observe any effect of hypercholesterolemia on increasing the vascular inflammatory effects in IFN- γ KO mice. Similar increases in serum cholesterol were observed between the wild type and the IFN- γ KO mice. Therefore, IFN- γ has been demonstrated to promote vascular inflammatory changes associated with increases in lesion mass. Conversely, disruption of this pathway with either IFN- γ or IFN- γ receptor ablation is associated with decreases in vascular lesions.

In a distinct form of atherosclerosis, graft coronary arteriosclerosis, the major late cause of cardiac allograft failure, the role of IFN- γ in the pathology associated with graft arterial disease has been investigated in IFN- γ deficient mice. Allogeneic donor hearts were transplanted into wild type C57/B6 or into IFN- γ KO mice and both myocardial rejection and graft arterial disease monitored. While myocardial rejection was similar between the two crosses, there was no detectable graft arterial disease or intimal thickening detected in the IFN- γ KO recipients [166]. The increases in class II antigens, ICAM-1 and VCAM-1 associated with graft disease in the allograft were attenuated in the IFN- γ KO recipient. The role for IFN- γ in graft artery disease was independently demonstrated in this same study by preventing graft artery disease in the wild type recipients when treated with a monoclonal antibody against IFN- γ . Similar results were observed when BALB/c hearts were transplanted into wild type immunosuppressed C57 or IFN- γ KO recipient mice [165]. Lesions consistent with graft arterial disease including significant intimal thickening, severe luminal occlusion, and

a SMC enriched neointima were observed when the donor hearts were transplanted into the C57 recipient. In distinction, these same parameters of arterial disease were reduced by greater than 50% when hearts were grafted into IFN- γ KO recipients.

In separate studies, transplant of human epicardial coronary arteries into the aorta of SCID mice with transfer of human peripheral blood mononuclear cells resulted in infiltration of IFN- γ expressing human T cells into the allograft [164]. This infiltration was associated with intima as well as adventitial thickening and vascular inflammation of the graft. Treatment of the recipients with anti IFN- γ monoclonal antibodies resulted in inhibition of the intimal thickening and adventitia expansion while IFN- γ infusion exacerbated these effects. In a related model involving porcine or human epicardial coronary artery transplant into the aorta of SCID mice, infusion of porcine or human IFN- γ resulted in graft intimal thickening and increased intimal cellularity without similar effects in the adjacent mouse aortic tissue [137]. These vascular changes were associated with SMC proliferation and increased PDGF and PDGF receptor expression. These effects were apparent without infusion of peripheral blood mononuclear cells suggesting that IFN- γ was directly impacting the intima vascular SMC.

IFN- γ also contributes to graft arterial disease through changes in endothelial and inducible NOS [163]. Human coronary artery grafts in SCID mice coupled with human peripheral blood mononuclear cell infusion resulted in grafts, 7–9 days post-transplant, that were impaired for vessel relaxation to NO dependent vasodilators including bradykinin and substance P when compared to similar grafts without mononuclear cell infusion. Evaluation of vascular tone by two weeks revealed SMC dysfunction with depressed response to NO donors including nitroprusside. Inducible NOS was detected by histology in the infiltrating T cells and RT-PCR demonstrated increased iNOS and decreased eNOS in the graft. These changes in NOS expression were blocked with IFN- γ monoclonal antibody treatment. Therefore, the mononuclear cells infiltrating the graft had changes in NOS expression that could explain the aberrant response in vessel relaxation to bradykinin and these effects were reversible with IFN- γ neutralization. However, when similar studies were performed with TNF monoclonal antibodies, anti TNF reversed the eNOS effect whereas iNOS expression remained elevated. Collectively, these studies demonstrate that in pre-clinical models of graft arterial disease, IFN- γ can contribute to disease progression through intimal remodeling involving SMC proliferation and through dysregulation of eNOS and iNOS resulting in vascular tone impairment. These pre-clinical results provide support for the role of IFN- γ in human coronary graft arteriosclerosis.

IFN- γ contributes to other forms of vascular disease including abdominal aortic aneurysms. However, whether IFN- γ plays a protective or detrimental role is dependent on the nature of the aneurysm model [167, 168]. In one model, exposure of the external surface of the abdominal aorta, between the renal and bifurcation of the iliac arteries, to 0.25 M CaCl₂, resulted in aortic diameter increases at 8 weeks [167]. These increases in aortic diameter were not apparent in IFN- γ KO mice. Similar results were also seen in mice lacking CD4 positive cells where aneurysms could be reconstituted

in CD4 deficient mice with IFN- γ infusion. Gel zymography revealed depressed MMP-2 and MMP-9 in the IFN- γ and CD4 KO, while both were increased with IFN- γ infusion. The role of IFN- γ in MMP expression would suggest that IFN- γ contributes to abdominal aortic aneurysms through its stimulatory effects on MMPs and its inhibitory effects on collagen synthesis. The reported elevation of circulating IFN- γ levels in patients with abdominal aortic aneurysms would be consistent with these preclinical observations [176]. However, in a distinct model involving aortic transplantation into wild type or IFN- γ R KO recipients it was observed that allografts on the IFN- γ R KO background developed severe aneurysms with increases in MMP-2, 3, 9, 12, 13, 15 and 19 [168]. These grafts were associated with a shift towards a Th2 response with increases in IL-4 and the increases in aneurysms were inhibited with antibodies against IL-4. These results suggest a potential protective role for IFN- γ , at least in this form of abdominal aortic aneurysm, by maintaining a Th1 environment within the allograft.

In summary, most in vivo studies that have addressed the role of IFN- γ in atherosclerotic lesions would suggest a negative, pro-inflammatory role for this cytokine resulting in lesion progression. In addition, the well described effects of IFN- γ on endothelial cells, SMC and macrophages provides a mechanistic understanding as to how IFN- γ could contribute to plaque progression and eventual destabilization. However, as with the in vitro studies, there are in vivo examples where IFN- γ may provide a vascular protective effect, as in the allograft abdominal aortic aneurysm model. In total, the combined preclinical studies would suggest that in most phases of plaque development, IFN- γ , as a pro-inflammatory mediator, would promote plaque progression and destabilization. Clearly, the preclinical studies involving IFN- γ in graft arterial disease as well as in abdominal aortic aneurysms would suggest that IFN- γ plays a central role in many forms of vascular disease, beyond atherosclerosis. The involvement of IFN- γ in plaque progression would suggest that targeted interventions in the IFN- γ pathway might have a favorable impact on disease progression. However, it remains to be determined whether one will be able to effectively titer interventions, directed against the IFN- γ pathway, so as to minimize the impact on host defense.

IV. Statins as inhibitors of IFN- γ mediated inflammatory processes

3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG CoA) reductase competitive inhibitors or statins, by inhibiting *de novo* cholesterol biosynthesis, lower serum cholesterol and are the drug of choice for patients with elevated LDL cholesterol. In addition, the non-lipid dependent, anti-inflammatory effects of statins are increasingly being understood as also playing a role in reducing clinical events associated with atherosclerotic disease [177–181]. The expanding role for statin use in autoimmune diseases including multiple sclerosis [182] is evidence for their beneficial effects beyond LDL cholesterol lowering.

The in vitro effects of statins on IFN- γ mediated inflammatory processes associated with plaque progression will be considered (Table 4) to exemplify how statin anti-inflammatory

Statin ¹	Effect	Reference
A, C, F, S	Inhibits IFN- γ synthesis in activated T cells	[183, 185, 203]
A, L, P, S	Inhibits IFN- γ induced class II antigen in macrophages, endothelial cells	[180, 185, 191, 196]
A, L	Inhibits IFN- γ induced endothelial ICAM-1 and VCAM-1	[186, 192]
C, F	Inhibits IFN- γ induced endothelial RANTES, MCP-1	[194]
F, L	Inhibits iNOS induction and Stat1 phosphorylation, increases SOCS-3 in macrophages	[189, 198]
C, F	Increases iNOS, tetrahydrobiopterin, GTP cyclohydrolase I in IFN- γ induced SMC	[201, 202]
A, C, P, L, S	Inhibits IFN- γ induced CD40 in endothelial, SMC, macrophages, reduces CD40L induced IL-6, 8, MCP-1	[192, 193]
A	Inhibits IFN- γ induced CD40, 80, 86 in mouse and neopterin synthesis in human macrophages	[185, 187]

¹ Statin abbreviations: A – Atorvastatin, C – Cerivastatin, F – Fluvastatin, L – Lovastatin, P – Pravastatin, S – Simvastatin.

effects *in vivo* could occur in part through multiple interventions along the IFN- γ axis. Statins have been demonstrated to inhibit both IFN- γ production in T cells by shifting the T cell population towards the Th2 pathway [183–185] as well as inhibiting IFN- γ effects on macrophages, endothelial cells and vascular SMC [186–198]. In general, the *in vitro* and *in vivo* effects of statins on IFN- γ stimulated cellular changes were dose dependent and vary in potency depending on the specific statin. These effects were often reversible with *in vitro* supplementation of mevalonate, by circumventing the inhibitory effects on L-mevalonic acid synthesis, which are required precursors for isoprenoid biosynthesis.

In vitro effects of statins on IFN- γ activation of macrophages include inhibition of iNOS induction in LPS + IFN- γ stimulated RAW 264.7 cells [189, 198], neopterin synthesis in human macrophage lines [187], IFN- γ induction of CD40 [191, 195] and class II but not class I antigen on human macrophages [191], as well as increases in the costimulatory molecules CD40, CD80 and CD86 in primary mouse macrophages [185]. The decreased expression of CD40, CD80, CD86, and class II antigens would be anticipated to mitigate adaptive immunity within the atherosclerotic lesion by inhibiting antigen presentation and subsequent Th1 cell polarization. By reducing Th1 cell polarization a decrease in IFN- γ secretion would be expected, concomitant with increases in Th2 cytokines. Therefore, statins would be expected to disrupt this IFN- γ axis by inhibiting IFN- γ induced vascular gene changes within an atherosclerotic lesion as well as by reducing IFN- γ synthesis by activated T cells.

Statin effects on macrophages can occur through inhibiting Stat 1 phosphorylation on tyrosine 701, as observed for lovastatin and fluvastatin effects on RAW 264.7 cells in inhibiting iNOS induction, but can also occur without any effects on Stat1 phosphorylation or nuclear translocation as seen in human macrophage class II antigen induction [191]. In this latter case, atorvastatin, lovastatin and pravastatin inhibition of class II antigen expression was also seen in human endothelial cells and in both endothelial cells and macrophages involved a decreased expression of CIITA by inhibiting the inducible promoter IV activity of the transactivator CIITA.

Table 4. Statin effects on IFN- γ related inflammatory processes.

Similar inhibitory effects on IFN- γ induction of class II antigens on human microvascular endothelial cells have been reported for simvastatin and also involved inhibiting CIITA induction without effecting Stat1 phosphorylation [196]. These inhibitory effects were not seen in constitutive class II expression on dendritic cells or B cells nor in induction of class I antigen on endothelial cells [191]. Furthermore, that this inhibition of CIITA could occur without any inhibitory effects on Stat1 phosphorylation or translocation provides further support for Stat1 independent signaling for IFN- γ activation.

Statins can also inhibit IFN- γ effects on macrophages by increasing SOCS-3 expression [198]. In this study, RAW 264.7 treated with lovastatin or fluvastatin demonstrated a dose dependent increase in SOCS-3 message and protein without increasing the expression of SOCS-1, 2, 5 or 6. The increase in SOCS-3 was inhibited by exogenous mevalonate. Statin mediated SOCS-3 induction was also associated with an inhibition of IFN- γ induced Stat1 phosphorylation. The demonstration of statin mediated inhibition of IFN- γ induced Stat1 phosphorylation in this instance but not in human macrophages or endothelial cells [191, 196] suggests that species and or differences in cell types can determine whether statin effects on IFN- γ stimulated gene changes are through inhibiting Stat1 phosphorylation. Statin inhibitory effects on macrophages extend beyond inhibiting the IFN- γ axis with antioxidant effects and inhibition of oxidized LDL uptake by macrophages being observed [199]. Furthermore, patients treated with simvastatin have reduced circulating levels of IL-6, IL-8 and MCP-1 with similar effects observed *in vitro* in stimulated peripheral blood mononuclear cells and endothelial cells [200].

Statin inhibitory effects on IFN- γ inducible genes in both endothelial cells and vascular SMC are similar to those observed in macrophages. Statins, for example, inhibit IFN- γ induced CD40 expression in human endothelial and SMC. These effects were dose dependent and reversible by L-mevalonate [192, 193]. In addition, CD40 ligand induced IL-6, IL-8 and MCP-1 secretion were reduced in these statin treated cells. IFN- γ induction of cellular adhesion molecules including ICAM-1 and VCAM-1 was inhibited in

the transformed human endothelial cell line ECV304 [186] and in primary human endothelial cells [192] respectively. Lovastatin treatment of the ECV304 cells did not inhibit tyrosine 701 phosphorylation of Stat1 but did inhibit serine 727 phosphorylation as well as phosphorylation of the ERK kinases on threonine 202 and tyrosine 204 [186]. Neither the inhibitory effects of atorvastatin on CD40 increases in IFN- γ and TNF stimulated human endothelial cells nor were the decreases in Stat1 and NF κ B nuclear translocation and IRF-1 synthesis reversible by L-mevalonate. However, the inhibition of VCAM-1 induction was reversible with L-mevalonate suggesting that within the same cell type statin effects on IFN- γ stimulated surface changes can be through pathways dependent and independent of mevalonate depletion.

Statins have also been demonstrated to inhibit cytokine secretion in stimulated endothelial cells [194, 200]. Cerivastatin and fluvastatin treatment of mouse endothelial cells stimulated with IFN- γ and TNF resulted in a dose dependent reduction in RANTES and MCP-1 chemokine production that was reversible with L-mevalonate [194]. In distinction to these inhibitory effects, cerivastatin and fluvastatin have been reported to increase both iNOS mRNA as well as the levels of BH4 and guanosine triphosphate cyclohydrolase I mRNA in rat vascular SMC stimulated with IL-1 and IFN- γ [201, 202]. This stimulatory effect on iNOS mRNA in the statin treated cells was inhibited with the addition of exogenous L-mevalonate.

In addition to their direct effects on IFN- γ mediated changes in vascular endothelial, SMC and macrophages, statins have also been reported to decrease the production of IFN- γ by shifting T cell polarization towards a Th2 phenotype. Statins decreased IFN- γ secretion and increased IL-4 production in CD4 positive T cells stimulated in vitro with anti CD3 antibodies and splenic antigen presenting cells [183]. This effect was dose dependent and reversible with L-mevalonate. Furthermore, in vivo treatment with cerivastatin decreased IFN- γ synthesis following ex vivo ovalbumin challenge in ovalbumin sensitized mouse lymph node cells. While these effects were first reported in mouse lymphoid cells, a recent study in patients with type II dyslipidemia reported similar results [203]. Patients with type IIa and type IIb dyslipidemia have increased levels of IFN- γ release from phytohemagglutinin stimulated lymphocytes. These increases in the type IIa dyslipidemic patients were significantly reduced after 30 or 90 days treatment with fluvastatin or simvastatin.

In summary, these studies would suggest that statins can inhibit IFN- γ induced cellular changes associated with a pro-inflammatory state and that in many but not all instances these effects were reversible by providing exogenous L-mevalonate to bypass the block in isoprenoid synthesis. Furthermore, by reducing IFN- γ production in T cells, in part by favoring a Th2 polarization as well as by inhibiting IFN- γ inducible antigen presentation, statins appear to inhibit at multiple points in the IFN- γ pathway. It would be anticipated that statins will have similar effects within the microenvironment of an atherosclerotic lesion. Clearly statins could exert an overall beneficial effect on plaque stability, independent of LDL cholesterol lowering, by inhibiting IFN- γ inducible pro-inflammatory gene changes as well as by reducing IFN- γ levels within the microenvironment of the atherosclerotic plaque.

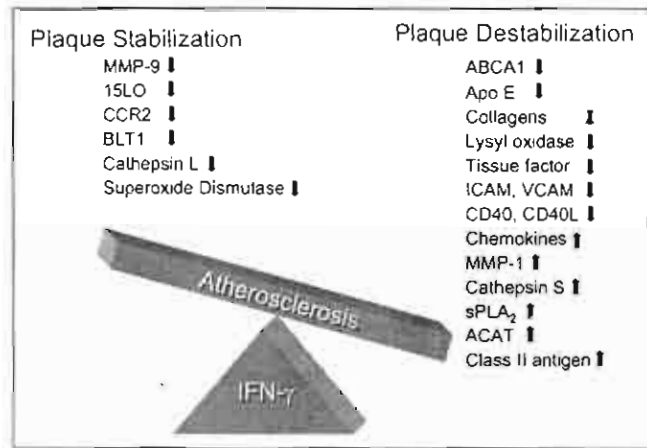


Figure 1. IFN- γ plays central role in the progression of the atherosclerotic plaque. Changes in gene expression consistent with reducing reverse cholesterol transport, decreasing matrix synthesis, increasing cellular infiltration, procoagulant changes and enhanced activation of both adaptive and innate immunity are observed. While gene changes are also observed that would promote plaque stabilization, the overall profile suggests that IFN- γ will shift the balance towards increased plaque destabilization.

Conclusions

In vitro studies using human and murine macrophages, SMC, and endothelial cells as well as in vivo studies in rodent models provide both evidence and mechanistic understanding for the central and pathologic role that IFN- γ plays in plaque progression and atherosclerotic disease. These pathologic processes include pro-inflammatory changes within the microenvironment of the atherosclerotic lesion, as well as the disruption of lipid trafficking and reverse cholesterol transport, all of which contribute to vascular disease. While in vitro data is also available which suggests a potential vascular protective role for IFN- γ , most gene changes induced by IFN- γ in macrophages, endothelial and SMC are consistent with the concept that IFN- γ will contribute to plaque progression and destabilization (Fig. 1). Inhibition of IFN- γ processes at the systemic level will, as with other interventions targeting innate or adaptive immunity, likely have a negative impact on host defense. Whether these issues can be resolved through a more aggressive dosing regimen coupled with biomarkers to predict a positive impact on coronary events is unclear.

In summary, the fundamental question regarding the central role of IFN- γ in atherosclerosis is whether inhibiting this pathway by IFN- γ receptor antagonists, by activating negative feedback loops such as increasing SOCS-1 and SOCS-3 expression, or targeting kinases down stream of receptor ligation such as JAK2 will provide a greater efficacy with an acceptable safety window than seen with current pharmaceuticals. While statins will remain the foundation for the treatment of atherosclerosis, opportunities for additional and more targeted interventions in the IFN- γ signaling pathway remain exciting goals for pharmacologic intervention.

Acknowledgements. M. Alfaro Leon wishes to acknowledge Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexico for pre-doctoral fellowship support.

References

- [1] Ross R. Atherosclerosis – An inflammatory disease. *New Engl J Med* 1999; 340: 115–126.
- [2] Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Schwartz SM. Lessons from sudden coronary death. A comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1262–1275.
- [3] Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *New Engl J Med* 2005; 352: 1685–1695.
- [4] Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002; 420: 868–874.
- [5] Langheinrich AC, Bohle RM. Atherosclerosis: humoral and cellular factors of inflammation. *Virchows Arch* 2005; 446: 101–111.
- [6] Getz GS. Immune function in atherogenesis. *J Lipid Res* 2005; 46: 1–10.
- [7] McMillan DE. Blood flow and the localization of atherosclerotic plaques. *Stroke* 1985; 16: 582–587.
- [8] Nakashima Y, Raines EW, Plump AS, Breslow JL, Ross R. Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis prone sites on the endothelium in the Apo E deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 842–851.
- [9] Linton MF, Fazio S. Macrophages, inflammation, and atherosclerosis. *Internat J Obesity* 2003; 27: S35–S40.
- [10] Szmik PE, Wang C-H, Weisel RD, de Almeida JR, Anderson TJ, Verma S. New markers of inflammation and endothelial cell activation. *Circulation* 2003; 108: 1917–1923.
- [11] Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis: The road ahead. *Cell* 2001; 104: 503–516, 2001.
- [12] Hansson GK, Berne GP. Atherosclerosis and the immune system. *Acta Paediatr Suppl* 2004; 446: 63–69.
- [13] Tabas I. Consequences of cellular cholesterol accumulation: Basic concepts and physiological implications. *J Clin Invest* 2002; 110: 905–911.
- [14] Vainio S, Ikonen E. Macrophage cholesterol transport: A critical player in foam cell formation. *Ann Med* 2003; 35: 146–155.
- [15] Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon- γ . *Annu Rev Immunol* 1997; 15: 749–795.
- [16] Stark GR, Kerr IM, Williams BRG, Silverman RH, Schreiber RD. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 227–264.
- [17] Pestka S, Krause CD, Walter MR. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev* 2004; 202: 8–32.
- [18] Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 2004; 75: 163–189.
- [19] Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989; 7: 145–173.
- [20] Sad S, Marcotte R, Mosmann TR. Cytokine-induced differentiation of precursor mouse CD8⁺ T cells into cytotoxic CD8⁺ T cells secreting Th1 or Th2 cytokines. *Immunity* 1995; 2: 271–279.
- [21] Munder M, Mallo M, Eichmann K, Modolell M. Murine macrophages secrete interferon gamma upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: A novel pathway of autocrine macrophage activation. *J Exp Med* 1998; 187: 2103–2108.
- [22] Bancroft GJ, Schreiber RD, Unanue ER. Natural immunity: a T-cell independent pathway of macrophage activation, defined in the scid mouse. *Immunol Rev* 1991; 124: 5–24.
- [23] Flaishon L, Hershkovitz R, Lantner F, Lider O, Alon R, Levo Y, et al., Autocrine secretion of interferon gamma negatively regulates homing of immature B cells. *J Exp Med* 2000; 192: 1381–1388.
- [24] Gerdes N, Sukhova GK, Libby P, Reynolds RS, Young JL, Schonbeck U. Expression of Interleukin (IL)-18 and functional IL-18 receptor on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: Implications for atherogenesis. *J Exp Med* 2002; 195: 245–257.
- [25] Frostegard J, Ulfgren A-K, Nyberg P, Hedin U, Swedenborg J, Andersson U, et al. Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. *Atherosclerosis* 1999; 145: 33–43.
- [26] Zhou X, Paulsson G, Stemme S, Hansson GK. Hypercholesterolemia is associated with a Th1/Th2 switch of the autoimmune response in atherosclerotic apo E-knockout mice. *J Clin Invest* 1998; 101: 1717–1725.
- [27] Geng YJ, Holm J, Nygren S, Bruzelius M, Stemme S, Hansson GK. Expression of the macrophage scavenger receptor in atheroma. Relationship to immune activation and the T-cell cytokine interferon-gamma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 1995–2002.
- [28] Hansson GK, Holm J, Jonasson L. Detection of activated T lymphocytes in the human atherosclerotic plaque. *Am J Pathol* 1989; 135: 169–175.
- [29] Yoshimoto T, Takeda K, Tanaka T, Ohkusu K, Kashiwamura S, Okamura H, et al. IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN-gamma production. *J Immunol* 1998; 161: 3400–3407.
- [30] Walter MR, Windsor WT, Nagabhushan TL, Lundell DJ, Lunn CA, Zauodny PJ, et al. Crystal structure of a complex between interferon- γ and its soluble high-affinity receptor. *Nature* 1995; 376: 230–235.
- [31] Krause CD, Mei E, Xie J, Jia Y, Bopp MA, Hochstrasser RM, et al. Seeing the light: preassembly and ligand-induced changes of the interferon γ receptor complex in cells. *Mol Cell Proteomics* 2002; 1: 805–815.
- [32] Igarashi K, Garotta G, Ozmen L, Ziemiecki A, Wilks AF, Harpur AG, et al. Interferon induces tyrosine phosphorylation of interferon- γ receptor and regulated association of protein kinases, Jak1 and Jak2, with its receptor. *J Biol Chem* 1994; 269: 14333–14336.
- [33] Briscoe J, Rogers NC, Witthuhn BA, Watling D, Harpur AG, Wilks AF, et al. Kinase-negative mutants of Jak1 can sustain interferon-gamma-inducible gene expression but not an antiviral state. *EMBO J* 1996; 15: 799–809.
- [34] Greenlund AC, Farrar MA, Viviano BL, Schreiber RD. Ligand induced IFN- γ receptor tyrosine phosphorylation couples the receptor to its signal transduction system. *EMBO J* 1994; 13: 1591–1600.
- [35] Heim MH, Kerr IM, Stark GR, Darnell JE. Contribution of STAT SH2 groups to specific interferon signaling by the Jak-STAT pathway. *Science* 1995; 267: 1347–1349.
- [36] Nguyen H, Ramana CV, Bayes J, Stark GR. Roles of phosphatidylinositol 3-kinase in interferon- γ -dependent phosphorylation of STAT1 on serine 727 and activation of gene expression. *J Biol Chem* 2001; 276: 33361–33368.
- [37] Sato M, Taniguchi T, Tanaka N. The interferon system and interferon regulatory factor transcription factors – studies from gene knockout mice. *Cytokine & Growth Factor Rev* 2001; 12: 133–142.
- [38] Taniguchi T, Ogasawara K, Takaoka A, Tanaka N. IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annu Rev Immunol* 2001; 19: 623–655.
- [39] Kumatori A, Yang D, Suzuki S, Nakamura M. Cooperation of STAT-1 and IRF-1 in interferon- γ -induced transcription of the gp91^{phox} gene. *J Biol Chem* 2002; 277: 9103–9111.
- [40] Morris AC, Beresford GW, Mooney MR, Boss JM. Kinetics of a gamma interferon response: expression and assembly of CIITA promoter IV and inhibition by methylation. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 4781–4791.
- [41] Brucet M, Marques L, Sebastian C, Lloberas J, Celada A. Regulation of murine Tap1 and Lmp2 genes in macrophages by interferon gamma is mediated by Stat1 and IRF-1. *Genes & Immun* 2004; 5: 26–35.
- [42] Blanco JCG, Contursi C, Salkowski CA, DeWitt DL, Ozato K, Vogel SN. Interferon regulatory factor (IRF)-1 and IRF-2 regulate interferon gamma-dependent cyclooxygenase 2 expression. *J Exp Med* 2000; 191: 2131–2144.
- [43] Van Gravesande KS, Layne MD, Ye Q, Le L, Baron RM, Perrella MA, et al. IFN regulatory factor-1 regulates IFN-gamma dependent cathepsin S expression. *J Immunol* 2002; 168: 4488–4494.
- [44] Saito H, Morita Y, Fujimoto M, Narazaki M, Naka T, Kishimoto T. IFN regulatory factor-1 mediated transcriptional activation of mouse STAT-induced STAT inhibitor-1 gene promoter by IFN-gamma. *J Immunol* 2000; 164: 5833–5843.

- [45] Xiong H, Zhu C, Li H, Chen F, Mayer L, Ozato K et al. Complex formation of the interferon (IFN) consensus sequence-binding protein with IRF-1 is essential for murine macrophage IFN- γ induced iNOS gene expression. *J Biol Chem* 2003; 278: 2271–2277.
- [46] Hurgin V, Novick D, Rubinstein M. The promoter of IL-18 binding protein: Activation by an IFN- γ -induced complex of IFN regulatory factor 1 and CCAAT/enhancer binding protein β . *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 16957–16962.
- [47] Gil MP, Bohn E, O'Guin AK, Ramana CV, Levine B, Stark GR. Biologic consequences of Stat1-independent IFN signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 6680–6685.
- [48] Ramana CV, Gil MP, Han Y, Ransohoff RM, Schreiber RD, Stark GR. Stat1-independent regulation of gene expression in response to IFN- γ . *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 6674–6679.
- [49] Ramana CV, Gil MP, Schreiber RD, Stark GR. Stat1-dependent and-independent pathways in IFN- γ -dependent signaling. *Trends Immunol* 2002; 23: 96–101.
- [50] Ramana CV, Kumar A, Enelow R. Stat1-independent induction of SOCS-3 by interferon- γ is mediated by sustained activation of Stat3 in mouse embryonic fibroblasts. *Biochem Biophys Res Comm* 2005; 327: 727–733.
- [51] Qing Y, Stark GR. Alternative activation of Stat1 and Stat3 in response to interferon- γ . *J Biol Chem* 2004; 279: 41679–41685.
- [52] Takaoka A, Tanaka N, Mitani Y, Miyazaki T, Fujii H, Sato M et al. Protein tyrosine kinase Pyk2 mediates the Jak-dependent activation of MAPK and Stat1 in IFN- γ , but not IFN- α , signaling. *EMBO J* 1999; 18: 2480–2488.
- [53] Sizemore N, Agarwal A, Das K, Lerner N, Sulak M, Rani S et al. Inhibitor of κ B kinase is required to activate a subset of interferon γ -stimulated genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 7994–7998.
- [54] Alexander WS, Hilton DJ. The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response. *Annu Rev Immunol* 2004; 22: 503–529.
- [55] Yamada S, Shiono S, Joo A, Yoshimura A. Control mechanism of Jak/Stat signal transduction pathway. *FEBS Letts* 2003; 534: 190–196.
- [56] Marine JC, Topham DJ, McKay C, Wang D, Parganas E, Stravopodis D et al. SOCS1 deficiency causes a lymphocyte-dependent perinatal lethality. *Cell* 1999; 98: 609–616.
- [57] Shuliz LD, Schweitzer PA, Rajan TV, Yi T, Hle JN, Matthews RJ et al. Mutations at the murine mofheaten locus are within the hematopoietic cell protein tyrosine phosphatase (HepH) gene. *Cell* 1993; 73: 1445–1454.
- [58] Yasukawa H, Misawa H, Sakamoto H, Masuhara M, Sasaki A, Wakioka T et al. The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop. *EMBO J* 1999; 18: 1309–1320.
- [59] Ungureanu D, Saharinen P, Junttila I, Hilton DJ, Silvennoinen O. Regulation of Jak2 through the ubiquitin-proteasome pathway involves phosphorylation of Jak2 on Y1007 and interaction with SOCS-1. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 3316–3326.
- [60] Kamizono S, Hanada T, Yasukawa H, Minoguchi S, Kato R, Minoguchi M et al. The SOCS box of SOCS-1 accelerates ubiquitin-dependent proteolysis of TEL-JAK2. *J Biol Chem* 2001; 276: 12530–12538.
- [61] Chung Y, Costa-Pereira AP, Watling D, Stark GR. Role of tyrosine 441 of interferon- γ receptor subunit 1 in SOCS-1-mediated attenuation of Stat1 activation. *J Biol Chem* 2005; 280: 1849–1853.
- [62] You M, Yu D-H, Feng G-S. Shp-2 tyrosine phosphatase functions as a negative regulator of the interferon-stimulated Jak/Stat pathway. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 2416–2424.
- [63] Liu B, Liao J, Rao X, Kushner SA, Chung CD, Chang DD et al. Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 10626–10631.
- [64] Song MM, Shwai K. The suppressor of cytokine signaling (SOCS) 1 and SOCS3 but not SOCS2 proteins inhibit interferon-mediated antiviral and antiproliferative activities. *J Biol Chem* 1998; 273: 35056–35062.
- [65] Starr R, Wilson TA, Viney EM, Murray LJ, Rayner JR, Jenkins BJ et al. A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* 1997; 387: 917–921.
- [66] Ito S, Ansari P, Sakatsume M, Dickensheets H, Vazquez N, Donnelly RP et al. Interleukin-10 inhibits expression of both interferon α - and interferon γ -induced genes by suppressing tyrosine phosphorylation of STAT1. *Blood* 1999; 93: 1456–1463.
- [67] Camejo EH, Rosengren B, Camejo G, Sartipy P, Fager G, Bonders G. Interferon gamma binds to extracellular matrix chondroitin-sulfate proteoglycans, thus enhancing its cellular response. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 1456–1465.
- [68] Camejo EH, Rosengren B, Sartipy P, Elfsberg K, Camejo G, Svensson L. CD44, a cell surface chondroitin sulfate proteoglycan, mediates binding of interferon- γ and some of its biological effects on human vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1999; 274: 18957–18964.
- [69] Wagsater D, Olofsson PS, Norgren L, Stenberg B, Sirsjo A. The chemokines and scavenger receptor CXCL16/SR-PSOX is expressed in human vascular smooth muscle cells and is induced by interferon γ . *Biochem Biophys Res Comm* 2004; 325: 1187–1193.
- [70] Wuttge DM, Zhou X, Sheikine Y, Wagsater D, Stemme V, Hedin U et al. CXCL16/SR-PSOX is an interferon- γ -regulated chemokine and scavenger receptor expressed in atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 750–755.
- [71] Geng Y-J, Hansson GK. Interferon-gamma inhibits scavenger receptor expression and foam cell formation in human monocyte-derived macrophages. *J Clin Invest* 1992; 89: 1322–1330.
- [72] Nakagawa T, Nozaki S, Nishida M, Yakub JM, Tomiyama Y, Nakata A et al. Oxidized LDL increases and interferon-gamma decreases expression of CD36 in human monocyte-derived macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 1350–1357.
- [73] Panousis CG, Zuckerman SH. Regulation of cholesterol distribution in macrophage-derived foam cells by interferon- γ . *J Lipid Res* 2000; 41: 75–83.
- [74] Grewal T, Pricceptu E, Davignon J, Bernier L. Identification of a (gamma)-interferon-responsive element in the promoter of the human macrophage scavenger receptor A gene. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 825–831.
- [75] Li H, Freeman MW, Libby P. Regulation of smooth muscle cell scavenger receptor expression in vivo by atherogenic diets and in vitro by cytokines. *J Clin Invest* 1995; 95: 122–133.
- [76] Hussaini IM, LaMarre J, Lysiak JL, Kams LR, VandenBerg SR, Gonias SL. Transcriptional regulation of LDL receptor-related protein by IFN- γ and the antagonistic activity of TGF- β 1 in the RAW 264.7 macrophage-like cell line. *J Leukoc Biol* 1996; 59: 733–739.
- [77] LaMarre J, Wolf BB, Kittler ELS, Quesenberry PJ, Gonias SL. Regulation of macrophage α -2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein by lipopolysaccharide and interferon- γ . *J Clin Invest* 1993; 91: 1219–1224.
- [78] Garner B, Baontina A, Dean RT, Jessup W. Regulation of serum-induced lipid accumulation in human monocyte-derived macrophages by interferon-gamma. Correlations with apolipoprotein E production, lipoprotein lipase activity and LDL receptor-related protein expression. *Atherosclerosis* 1997; 128: 47–58.
- [79] Kosaka S, Takahashi S, Masamura K, Kanehara H, Sakai J, Tohda G et al. Evidence of macrophage foam cell formation by very low-density lipoprotein receptor: Interferon-(gamma) inhibition of very low-density lipoprotein receptor expression and foam cell formation in macrophages. *Circulation* 2001; 103: 1142–1147.
- [80] Skiba PJ, Keesler GA, Tabas I. Interferon-gamma down-regulates the lipoprotein (a)/apoprotein (a) receptor activity on macrophage foam cells. Evidence for disruption of ligand-induced receptor recycling by interferon-gamma. *J Biol Chem* 1994; 269: 23059–23067.
- [81] Reiss AB, Patel CA, Rahman MM, Chan ESL, Hasneen K, Montesinos MC et al. Interferon- γ impedes reverse cholesterol transport and promotes foam cell transformation in THP-1 human monocytes/macrophages. *Med Sci Monit* 2004; 10: BR420–BR425.
- [82] Panousis CG, Zuckerman SH. Interferon- γ induces downregulation of Tangier disease gene (ATP-binding-cassette transporter 1) in macrophage-derived foam cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1565–1571.

- [83] Wang X-Q, Panousis CG, Alfaro ML, Evans GF, Zuckerman SH. Interferon- γ -mediated downregulation of cholesterol efflux and ABC1 expression is by the Stat1 pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: e5-e9.
- [84] Jonasson L, Hansson GK, Bonders G, Noe L, Etienne J. Interferon-gamma inhibits lipoprotein lipase in human monocyte-derived macrophages. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1053: 43-48.
- [85] Zuckerman SH, Evans GF, O'Neal L. Cytokine regulation of macrophage apo E secretion: opposing effects of GM-CSF and TGF- β . *Atherosclerosis* 1992; 96: 203-214.
- [86] Oropeza RL, Schreiber R, Werb Z. Regulation of apolipoprotein E expression in macrophages by γ -interferon. In: Sorg, C. and Schimpl, S. (Eds.), *Cellular and Molecular Biology of Lymphokines*. Academic Press, NY 1985. p303-307.
- [87] Reiss AB, Awadallah NW, Malhotra S, Montesinos MC, Chan ESL, Javitt NB et al. Immune complexes and IFN- γ decrease cholesterol 27-hydroxylase in human arterial endothelium and macrophages. *J Lipid Res* 2001; 42: 1913-1922.
- [88] Yang J-B, Duan Z-J, Yao W, Lee O, Yang L, Yang X-Y et al. Synergistic transcriptional activation of human Acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase-1 gene by interferon- γ and all-trans-retinoic acid THP-1 cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 20989-20998.
- [89] Peilot H, Rosengren B, Bonders G, Hurt-Camejo E. Interferon- γ induces secretory group IIA phospholipase A₂ in human arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2000; 275: 22895-22904.
- [90] Menschikowski M, Hagelgans A, Hempel U, Siegert G. Glycogen synthase kinase-3 beta negatively regulates group IIA phospholipase A₂ expression in human aortic smooth muscle and HepG2 hepatoma cells. *FEBS Letts* 2004; 577: 81-86.
- [91] Hansson GK, Jonasson L, Holm J, Clowes MM, Clowes AW. Gamma-interferon regulates vascular smooth muscle proliferation and Ia antigen expression in vivo and in vitro. *Circ Res* 1988; 63: 712-719.
- [92] Stentme S, Fager G, Hansson GK. MHC class II antigen expression in human vascular smooth muscle cells is induced by interferon-gamma and modulated by tumour necrosis factor and lymphotoxin. *Immunol* 1990; 69: 243-249.
- [93] Mach B, Steimle V, Martínez-Soria E, Reith W. Regulation of MHC class II genes: lessons from a disease. *Annu Rev Immunol* 1996; 14: 301-331.
- [94] Stemme S, Faber B, Holm J, Wiklund O, Witztum JL, Hansson GK. T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized LDL. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 3893-3897.
- [95] Yla-Herttuala S, Palinski W, Butler SW, Picard S, Steinberg D, Witztum JL. Rabbit and human atherosclerotic lesions contain IgG that recognizes epitopes of oxidized LDL. *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 32-40.
- [96] Manyak CL, Tse H, Fischer P, Coker L, Sigal NH, Koo GC. Regulation of class II MHC molecules on human endothelial cells: Effects of IFN and dexamethasone. *J Immunol* 1988; 140: 3817-3821.
- [97] Goes N, Urmsen J, Hobart M, Halloran PF. The unique role of interferon- γ in the regulation of MHC expression on arterial endothelium. *Transplantation* 1996; 62: 1889-1894.
- [98] Leeuwenberg JFM, Van Damme J, Meager T, Jeunhomme TMAA, Buurman WA. Effects of tumor necrosis factor on the interferon-gamma-induced major histocompatibility complex class II antigen expression by human endothelial cells. *Eur J Immunol* 1988; 18: 1469-1472.
- [99] Loukissa A, Cardozo C, Altschuffer-Felberg C, Nelson JE. Control of LMP7 expression in human endothelial cells by cytokines regulating cellular and humoral immunity. *Cytokine* 2000; 12: 1326-1330.
- [100] Ma W, Lebnor PJ, Cresswell P, Pober JS, Johnson DR. Interferon-gamma rapidly increases peptide transporter (TAP) subunit expression and peptide transport capacity in endothelial cells. *J Biol Chem* 1997; 272: 16585-16590.
- [101] Mahboubi K, Pober JS. Activation of signal transducer and activator of transcription 1 (Stat1) is not sufficient for the induction of Stat1-dependent genes in endothelial cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 8012-8021.
- [102] Min W, Pober JS, Johnson DR, David R. Interferon induction of TAP1: the phosphatase SHP-1 regulates crossover between the IFN-alpha/beta and the IFN-gamma signal-transduction pathways. *Circ Res* 1998; 83: 815-823.
- [103] Denk A, Goebeler M, Schmid S, Berberich I, Ritz O, Lindemann D et al. Activation of NF-kappaB kinase complex is both essential and sufficient for proinflammatory gene expression in primary endothelial cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 28451-28458.
- [104] Murakami S, Morioka T, Nakagawa Y, Suzuki Y, Arakawa M, Ojite T. Expression of adhesion molecules by cultured human glomerular endothelial cells in response to cytokines: Comparison to human umbilical vein and dermal microvascular endothelial cells. *Microvasc Res* 2001; 62: 383-391.
- [105] Melrose J, Tsurushita N, Liu G, Berg EL. IFN- γ inhibits activation-induced expression of E- and P-selectin on endothelial cells. *J Immunol* 1998; 161: 2457-2464.
- [106] Stewart RJ, Kashour TS, Marsden PA. Vascular endothelial platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) expression is decreased by TNF alpha and IFN-gamma: Evidence for cytokine-induced destabilization of messenger ribonucleic acid transcripts in bovine endothelial cells. *J Immunol* 1996; 156: 1221-1228.
- [107] Rollins BJ, Yoshimura T, Leonard EJ, Pober JS. Cytokine-activated human endothelial cells synthesize and secrete a monocyte chemoattractant, MCP-1/JE. *Amer J Pathol* 1990; 136: 1229-1233.
- [108] Hatakeyama M, Imaizumi T, Tamo W, Yamashita K, Yoshida H, Fukuda I et al. Heparin inhibits IFN-gamma induced fractalkine/CX3CL1 expression in human endothelial cells. *Inflammation* 2004; 28: 7-13.
- [109] Mach F, Sauty A, Iarossi AS, Sukhova GK, Neote K, Libby P et al. Differential expression of three T lymphocyte-activating CXC chemokines by human atheroma-associated cells. *J Clin Invest* 1999; 104: 1041-1050.
- [110] 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.
- [111] Aiello RJ, Bourassa P-AK, Lindsey S, Weng W, Natoli E, Rollins BJ et al. Monocyte chemoattractant protein-1 accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 1518-1525.
- [112] Mach F, Schonbeck U, Sukhova GK, Bourcier T, Bonnefoy J-Y, Pober JS et al. Functional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: Implications for CD40-CD40 ligand signaling in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 1931-1936.
- [113] Wagner AH, Gebauer M, Pollok-Kopp B, Hecker M. Cytokine-inducible CD40 expression in human endothelial cells is mediated by interferon regulatory factor-1. *Blood* 2002; 99: 520-525.
- [114] Schonbeck U, Libby P. CD40 signaling and plaque instability. *Circ Res* 2001; 89: 1092-1103.
- [115] Morel JCM, Park CC, Woods JM, Koch AE. A novel role for interleukin-18 in adhesion molecule induction through NF-kB and phosphatidylinositol (PI) 3-kinase-dependent signal transduction pathways. *J Biol Chem* 2001; 276: 37069-37075.
- [116] Sata M, Suhara T, Walsh K. Vascular endothelial cells and smooth muscle cells differ in expression of Fas and Fas ligand and in sensitivity to Fas ligand-induced cell death. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 309-316.
- [117] Collins PW, Noble KE, Reith JR, Hoffbrand AV, Pasi KJ, Yong KL. Induction of tissue factor expression in human monocyte/endothelium cocultures. *Brit J Haematol* 1995; 91: 963-970.
- [118] Huang A, Zhang Y-Y, Chen K, Hatakeyama K, Keaney JF. Cytokine-stimulated GTP cyclohydrolase I expression in endothelial cells requires coordinated activation of Nuclear Factor-kB and Stat1/Stat3. *Circ Res* 2005; 96: 164-171.
- [119] Katusic ZS, Stelter A, Müstien S. Cytokines stimulate GTP cyclohydrolase I gene expression in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 27-32.
- [120] Ozaki M, Seinosuke K, Yamashita T, Hirase T, Namiki M, Inoue N et al. Overexpression of endothelial nitric oxide synthase ac-

- celerates atherosclerotic lesion formation in apo E-deficient mice. *J Clin Invest* 2002; 110: 331–340.
- [121] Warner SJC, Friedman GB, Libby P. Immune interferon inhibits proliferation and induces 2'-5'-Oligoadenylate synthetase gene expression in human vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1989; 83: 1174–1182.
- [122] Geng YJ, Wu Q, Muszynski M, Hansson GK, Libby P. Apoptosis of vascular smooth muscle cells induced by in vitro stimulation with interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-1 beta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16: 19–27.
- [123] Ikeda Y, Takeuchi K, Kato T, Taniyama Y, Sato K, Takahashi N et al. Transcriptional suppression of rat angiotensin AT1a receptor gene expression by interferon-gamma in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 262: 494–498.
- [124] Bennett MR, Littlewood TD, Hancock DC, Evan GI, Newby AC. Down-regulation of the c-myc proto-oncogene in inhibition of vascular smooth-muscle cell proliferation: A signal for growth arrest? *Biochem J* 1994; 302: 701–708.
- [125] Ramana CV, Grammatikakis N, Chernov M, Nguyen H, Goh KC, Williams BR et al. Regulation of c-myc expression by IFN-gamma through Stat1-dependent and independent pathways. *EMBO J* 2000; 19: 263–272.
- [126] Vairo G, Vadiveloo PK, Royston AK, Rockman SP, Rock CO, Jackowski S et al. Deregulated c-myc expression overrides IFN-gamma-induced macrophage growth arrest. *Oncogene* 1995; 10: 1969–1976.
- [127] Amento EP, Ehsani N, Palmer H, Libby P. Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb* 1991; 11: 1223–1230.
- [128] Song YL, Ford JW, Gordon D, Shanley CJ. Regulation of lysyl oxidase by interferon-gamma in rat aortic smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 982–988.
- [129] Hansson GK, Hellstrand M, Rymo L, Rubbia L, Gabbiani G. Interferon gamma inhibits both proliferation and expression of differentiation-specific alpha-smooth muscle actin in arterial smooth muscle cells. *J Exp Med* 1989; 170: 1595–1608.
- [130] Sukhova GK, Shi G-P, Simon DI, Chapman HA, Libby P. Expression of the elastolytic cathepsins S and K in human atheroma and regulation of their production in smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1998; 102: 576–583.
- [131] Ludwig A, Berkhout T, Moores K, Groot P, Chapman G. Fractalkine is expressed by smooth muscle cells in response to IFN-gamma and TNF-alpha and is modulated by metalloproteinase activity. *J Immunol* 2002; 168: 604–612.
- [132] Leung KH. Release of soluble ICAM-1 from human lung fibroblasts, aortic smooth muscle cells, dermal microvascular endothelial cells, bronchial epithelial cells, and keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 260: 734–739.
- [133] Woods M, Wood EG, Bardswell SC, Bishop-Bailey D, Barker S, Wort SJ et al. Role for nuclear factor-kappaB and signal transducer and activator of transcription 1/interferon regulatory factor-1 in cytokine induced endothelin-1 release in human vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* 2003; 64: 923–931.
- [134] Barillari G, Albonici L, Incerpi S, Bogetto L, Pistrutto G, Volpi A et al. Inflammatory cytokines stimulate vascular smooth muscle cells locomotion and growth by enhancing alpha5beta1 integrin expression and function. *Atherosclerosis* 2001; 154: 377–385.
- [135] Braun M, Pietsch P, Zepp A, Schror K, Baumann G, Felix SB. Regulation of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta induced adhesion molecule expression in human vascular smooth muscle cells by cAMP. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2568–2575.
- [136] Shin WS, Hong Y-H, Peng H-B, De Caterina R, Libby P, Liao JK. Nitric oxide attenuates vascular smooth muscle cell activation by Interferon-gamma. *J Biol Chem* 1996; 271: 11317–11324.
- [137] Tellides G, Tereb DA, Kirkiles-Smith NC, Kim RW, Wilson JH, Schechner JS et al. Interferon-gamma elicits arteriosclerosis in the absence of leukocytes. *Nature* 2000; 403: 207–211.
- [138] Stralin P, Marklund SL. Multiple cytokines regulate the expression of extracellular superoxide dismutase in human vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 2000; 151: 433–441.
- [139] Stanford SJ, Pepper JR, Mitchell JA. Cytokine modulation of granulocyte macrophage-CSF and granulocyte-CSF release from stimulated vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 2002; 436: 241–244.
- [140] Pantoja LG, Miller RD, Ramirez JA, Molestina RE, Summersgill JT. Inhibition of Chlamydia pneumoniae replication in human aortic smooth muscle cells by gamma interferon-induced indoleamine 2,3-dioxygenase activity. *Infection Immun* 2000; 68: 6478–6481.
- [141] Sakasb JB, Byrne GI, Lichtman A, Libby P. Cytokines induce indoleamine 2,3-dioxygenase expression in human atheroma-associated cells: Implications for persistent Chlamydia pneumoniae infection. *Infection Immun* 2002; 70: 3959–3961.
- [142] Beers C, Honey K, Fink S, Forbush K, Rudensky A. Differential regulation of cathepsin S and cathepsin L in interferon gamma-treated macrophages. *J Exp Med* 2003; 197: 169–179.
- [143] Zhou M, Zhang Y, Ardans JA, Wahl LM. Interferon-gamma differentially regulates monocyte matrix metalloproteinase-1 and-9 through tumor necrosis factor-alpha and caspase 8. *J Biol Chem* 2003; 278: 45406–45413.
- [144] Greilberger J, Oettl K, Cvim G, Reibnegger G, Jurgens G. Modulation of LDL oxidation by 7,8-dihydroneopterin. *Free Radical Res* 2004; 38: 9–17.
- [145] Heasman SJ, Giles KM, Rossi AG, Allen JE, Haslett C, Dransfield I. Interferon gamma suppresses glucocorticoid augmentation of macrophage clearance of apoptotic cells. *Eur J Immunol* 2004; 34: 1752–1761.
- [146] Wynes MW, Riches DWH. Induction of macrophage insulin-like growth factor-I expression by the Th2 cytokines IL-4 and IL-13. *J Immunol* 2003; 171: 3550–3559.
- [147] Weitkamp B, Cullen P, Plenz G, Robenek H, Rauterberg J. Human macrophages synthesize type VIII collagen in vitro and in the atherosclerotic plaque. *FASEB J* 1999; 13: 1445–1457.
- [148] Rendon-Mitchell B, Oehani M, Li J, Han J, Wang H, Yang H et al. IFN-gamma induces high mobility group box 1 protein release partly through a TNF-dependent mechanism. *J Immunol* 2003; 170: 3890–3897.
- [149] Kalinina N, Agrotis A, Antropova Y, DiVitto G, Kanellakis P, Kostolias G et al. Increased expression of the DNA-binding cytokine HMGB1 in human atherosclerotic lesions. Role of activated macrophages and cytokines. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 2320–2325.
- [150] DeMarco RA, Fink MP, Lotze MT. Monocytes promote natural killer cell interferon gamma production in response to the endogenous danger signal HMGB1. *Mol Immunol* 2005; 42: 433–444.
- [151] Pettersson A, Sabirsh A, Bristulf J, Kidd-Ljunggren K, Ljunberg B, Owman C et al. Pro- and anti-inflammatory substances modulate expression of the leukotriene B₂ receptor, BLT1, in human monocytes. *J Leuk Biol* 2005; 77: 1018–1025.
- [152] Tangirala RK, Murao K, Quehenberger O. Regulation of expression of the human monocyte chemotactic protein-1 receptor (hCCR2) by cytokines. *J Biol Chem* 1997; 272: 8050–8056.
- [153] Penton-Rol G, Polentarutti N, Luini W, Borsani A, Mancinelli R, Sica A et al. Selective inhibition of expression of the chemokine receptor CCR2 in human monocytes by IFN-gamma. *J Immunol* 1998; 160: 3869–3873.
- [154] Creery D, Weiss W, Lim WT, Aziz JB, Kumar A. Down-regulation of CXCR-4 and CCR-5 expression by interferon-gamma is associated with inhibition of chemotaxis and human immunodeficiency virus (HIV) replication but not HIV entry into human monocytes. *Clin Exper Immunol* 2004; 137: 156–165.
- [155] Gupta SK, Lysko PG, Pillarisetti K, Ohstein E, Stadel JM. Chemokine receptors in human endothelial cells. Functional expression of CXCR4 and its transcriptional regulation by inflammatory cytokines. *J Biol Chem* 1998; 273: 4282–4287.
- [156] Conrad DJ, Kuhn H, Mulkins M, Highland E, Sigal E. Specific inflammatory cytokines regulate the expression of human monocyte 15-lipoxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 217–221.
- [157] Buechler C, Ritter M, Orso E, Langmann T, Klueken J, Schmitz G. Regulation of scavenger receptor CD163 expression in hu-

- man monocytes and macrophages by pro-and anti-inflammatory stimuli. *J Leuk Biol* 2000; 67: 97–103.
- [158] Colotta F, Borre A, Wang JM, Tattaneli M, Maddalena F, Polentarutti N et al. Expression of a monocyte chemotactic cytokine by human mononuclear phagocytes. *J Immunol* 1992; 148: 760–765.
- [159] Brown Z, Gerritsen ME, Carbery WW, Strieter RM, Kunkel SL, Westwick J. Chemokine gene expression and secretion by cytokine-activated human microvascular endothelial cells. Differential regulation of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in response to interferon-gamma. *Amer J Pathol* 1994; 145: 913–921.
- [160] Subbarao K, Jala VR, Mathis S, Suttles J, Zacharias W, Ahamed J et al. Role of leukotriene B4 receptors in the development of atherosclerosis: potential mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 369–375.
- [161] Aiello RJ, Bourassa PA, Lindsey W, Weng W, Freeman A, Showell HJ. Leukotriene B4 receptor antagonism reduces monocytic foam cells in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 443–449.
- [162] Peters W, Charo IF. Involvement of chemokine receptor 2 and its ligand, monocyte chemoattractant protein-1, in the development of atherosclerosis: Lessons from knockout mice. *Curr Opin Lipidol* 2001; 12: 175–180.
- [163] Koh KP, Wang Y, Yi T, Shiao SL, Lorber MI, Sessa WC et al. T cell-mediated vascular dysfunction of human allografts results from IFN- γ dysregulation of NO synthase. *J Clin Invest* 2004; 114: 846–856.
- [164] Wang Y, Burns WR, Tang PCY, Yi T, Scheehner JS, Zerwes HG et al. Interferon- γ plays a nonredundant role in mediating T cell-dependent outward vascular remodeling of allogeneic human coronary arteries. *FASEB J* 2004; 18: 606–608.
- [165] Raisanen-Sokolowski A, Glysing-Jensen T, Koglin J, Russell ME. Reduced transplant arteriosclerosis in murine cardiac allografts placed in interferon- γ knockout recipients. *Amer J Pathol* 1998; 152: 359–365.
- [166] Nagano H, Mitchell RN, Taylor MK, Hasegawa S, Tilney NL, Libby P. Interferon- γ deficiency prevents coronary arteriosclerosis but not myocardial rejection in transplanted mouse hearts. *J Clin Invest* 1997; 100: 550–557.
- [167] Xiong W, Zhao Y, Prall A, Greiner TC, Baxter BT. Key roles of CD4+ T cells and IFN- γ in the development of abdominal aortic aneurysms in a murine model. *J Immunol* 2004; 172: 2607–2612.
- [168] Shimizu K, Shichiri M, Libby P, Lee RT, Mitchell RN. Th2-predominant inflammation and blockade of IFN- γ signaling induce aneurysms in allografted aortas. *J Clin Invest* 2004; 114: 300–308.
- [169] Gupta S, Pablo AM, Jiang X-C, Wang N, Tall AR, Sehindler C. IFN- γ potentiates atherosclerosis in apoE knock-out mice. *J Clin Invest* 1997; 99: 2752–2761.
- [170] Buono C, Come CE, Stavrakis G, Maguire GF, Connelly PW, Lichtman AH. Influence of interferon- γ on the extent and phenotype of diet-induced atherosclerosis in the LDLR-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 454–460.
- [171] Whitman SC, Ravisankar P, Elam H, Daugherty A. Exogenous interferon- γ enhances atherosclerosis in apolipoprotein E^{-/-} mice. *Am J Pathol* 2000; 157: 1819–1824.
- [172] Whitman SC, Ravisankar P, Daugherty A. Interleukin-18 enhances atherosclerosis in apolipoprotein E^{-/-} mice through release of interferon- γ . *Circ Res* 2002; 90: e34–e38.
- [173] Tenger C, Sundborger A, Jawien J, Zhou X. IL-18 accelerates atherosclerosis accompanied by elevation of IFN- γ and CXCL16 expression independently of T cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 791–796.
- [174] Tenger C, Zhou X. Apolipoprotein E modulates immune activation by acting on the antigen-presenting cell. *Immunology* 2003; 109: 392–397.
- [175] Stokes KY, Clanton EC, Clements KP, Granger N. Role of interferon- γ in hypercholesterolemia-induced leukocyte-endothelial cell adhesion. *Circulation* 2003; 107: 2140–2145.
- [176] Juvonen J, Surcel HM, Satta J, Teppo AM, Bloigu A, Syrjala H et al. Elevated circulating levels of inflammatory cytokines in patients with abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2843–2847.
- [177] Marz W, Koenig W. HMG-CoA reductase inhibition: anti-inflammatory effects beyond lipid lowering. *J Cardiovasc Risk* 2003; 10: 169–179.
- [178] Schonbeck U, Libby P. Inflammation, immunity, and HMG-CoA reductase inhibitors. Statins as antiinflammatory agents? *Circulation* 2004; 109(Suppl II): II-18–II-26.
- [179] Luigens E, Daemen MJAP. HMG-CoA reductase inhibitors: lipid-lowering and beyond. *Drug Disc Today* 2004; 1: 189–194.
- [180] Mach F. Statins as immunomodulatory agents. *Circulation* 2004; 109(Suppl II): II-15–II-17.
- [181] Kwak BR, Mulhaupt F, Mach F. Atherosclerosis: Anti-inflammatory and immunomodulatory activities of statins. *Autoimmun Rev* 2003; 2: 332–338.
- [182] Nath N, Giri S, Prasad R, Singh AK, Singh I. Potential targets of 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A reductase inhibitor for multiple sclerosis therapy. *J Immunol* 2004; 172: 1273–1286.
- [183] Hakamada-Taguchi R, Uehara Y, Kuribayashi K, Numabe A, Saito K, Negoro H et al. Inhibition of Hydroxymethylglutaryl-Coenzyme A reductase reduces Th1 development and promotes Th2 development. *Circ Res* 2003; 93: 948–956.
- [184] Wakizono R, Suzuki J-I, Ogawa M, Futamatsu H, Koga N, Onai Y et al. HMG-CoA reductase inhibitor attenuates experimental autoimmune myocarditis through inhibition of T cell activation. *Cardiovasc Res* 2004; 64: 412–420.
- [185] Youssef S, Stuve O, Patarroyo JC, Ruiz PJ, Radosevich JL, Hur EMI et al. The HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, promotes a Th2 bias and reverses paralysis in central nervous system autoimmune disease. *Nature* 2002; 420: 78–84.
- [186] Chung KK, Lee IK, Kang H, Suh JM, Kim H, Park KC et al. Statin inhibits interferon- γ -induced expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Exper Mol Med* 2002; 34: 451–461.
- [187] Neurauer G, Wirleitner B, Laich A, Schennach H, Weiss G, Fuchs D. Atorvastatin suppresses interferon-gamma-induced neopterin formation and tryptophan degradation in human peripheral blood mononuclear cells and in monocytic cell lines. *Clin Exper Immunol* 2003; 131: 264–267.
- [188] Loike JD, Shabtai DY, Neuhut R, Malitzky S, Lu E, Husemann J et al. Statin inhibition of Fc receptor-mediated phagocytosis by macrophages is modulated by cell activation and cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 2051–2056.
- [189] Huang K-C, Chen C-W, Chen J-C, Lin W-W. HMG-CoA reductase inhibitors inhibit inducible nitric oxide synthase gene expression in macrophages. *J Biomed Sci* 2003; 10: 396–405.
- [190] Lindmark E, Siegbahn A. Tissue factor regulation and cytokine expression in monocyte-endothelial cell co-cultures. Effects of a statin, an ACE-inhibitor and a low-molecular weight heparin. *Thromb Res* 2003; 108: 77–84.
- [191] Kwak B, Mulhaupt F, Myit S, Mach F. Statins as a newly recognized type of immunomodulator. *Nature Med* 2000; 6: 1399–1402.
- [192] Wagner AH, Gebauer M, Guldenzoph B, Hecker M. 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl coenzyme A reductase-independent inhibition of CD40 expression by atorvastatin in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 1784–1789.
- [193] Mulhaupt F, Matter CM, Kwak BR, Pelli G, Veillard NR, Burger F et al. Statins (HMG-CoA reductase inhibitors) reduce CD40 expression in human vascular cells. *Cardiovasc Res* 2003; 59: 755–766.
- [194] Shimizu K, Masanori A, Takayama K, Libby P, Mitchell RN. Direct anti-inflammatory mechanisms contribute to attenuation of experimental allograft arteriosclerosis by statins. *Circulation* 2003; 108: 2113–2120.
- [195] Townsend KP, Shytle DR, Bai Y, San N, Zeng J, Freeman M et al. Lovastatin modulation of microglial activation via suppression of functional CD40 expression. *J Neuroscience Res* 2004; 78: 167–176.

- [196] Sadeghi MM, Tiglio A, Sadigh K, O'Donnell L, Collinge M, Parodi R et al. Inhibition of interferon-gamma-mediated microvascular endothelial cell major histocompatibility complex class II gene activation by HMG-CoA reductase inhibitors. *Transplantation* 2001; 71: 1262–1268.
- [197] Mach F. Statins as novel immunomodulators: From cell to potential clinical benefit. *Thromb Haemostas* 2003; 90: 607–610.
- [198] Huang K-C, Chen C-W, Chen J-C, Lin W-W. Statins induce suppressor of cytokine signaling-3 in macrophages. *FEBS Lett* 2003; 555: 385–389.
- [199] Davignon J, Jacob R, Mason RP. The antioxidant effects of statins. *Coronary Artery Disease*; 2004; 15: 251–258
- [200] Rezaie-Majd A, Maca T, Bucek RA, Valent P, Muller MR, Husstein P et al. Simvastatin reduces expression of cytokines interleukin-6, interleukin-8, and monocyte chemoattractant protein-1 in circulating monocytes from hypercholesterolemic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 1194–1199.
- [201] Hattori Y, Nakanishi N, Suzuki M, Yoshida M, Kasai K. 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors enhance cytokine-mediated induction of nitric oxide synthesis in vascular smooth muscle cells. *Pteridines* 2002; 13: 26–31.
- [202] Hattori Y, Nakanishi N, Kasai K. Statin enhances cytokine mediated induction of nitric oxide synthesis in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 2002; 54: 649–658.
- [203] Okopien B, Krysiak R, Kowalski J, Madaj A, Belowski D, Zielinski M et al. The effect of statins and fibrates on interferon-gamma and interleukin-2 release in patients with primary type II dyslipidemia. *Atherosclerosis* 2004; 176: 327–335.



To access this journal online:
<http://www.birkhauser.ch>
