

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Klinik und Poliklinik für Vaskuläre und Endovaskuläre Chirurgie

Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München

(Prof. Dr. Hans-Henning Eckstein)

**Epigenetische Veränderungen in Atherosklerose:
Histonmethylierung und –acetylierung
in Läsionen von Patienten mit höhergradiger Carotisstenose**

Anna Greißel

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen

Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation: 1. Prof. Dr. Hans-Henning Eckstein

2. Prof. Dr. Claus Zimmer

Die Dissertation wurde am 27.04.2016 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 15.02.2017 angenommen.

Vorbemerkung

Bei der folgenden Dissertation wurde die Form der publikationsbasierten Promotion (gemäß TUM Promotionsordnung §6) gewählt, basierend auf zwei akzeptierten Erstautorenveröffentlichungen des Doktoranden. Den als Appendix beigefügten Originalarbeiten kann man jeweils die detaillierten Ausführungen zu Einleitung, Methoden, Resultaten und Diskussion entnehmen. Im folgenden einleitenden Textteil werden die beiden Publikationen zusammenfassend dargestellt, wobei auf die wichtigsten Methoden und Ergebnisse kurz eingegangen wird.

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	1
1.1 Atherosklerose	1
1.1.1 Definition, Epidemiologie, Risikofaktoren und Pathologie im Bereich der Carotisarterien.....	1
1.1.2. Pathogenese und histologische Klassifikation.....	3
1.2. Epigenetik.....	4
1.2.1. Epigenetik – ein kurzer Überblick.....	4
1.2.1.1 DNA- und Histonmodifikationen.....	6
1.2.1.2 DNA-Methylierung.....	7
1.2.1.3. Histonmethylierung.....	7
1.2.1.4 Histonacetylierung	9
1.2.2 Einfluss der Epigenetik auf die Atherosklerose – bisherige Studienlage.....	9
1.3. Ziele der Arbeit	11
2. Material und Methoden	12
2.1. Untersuchungsmaterial	12
2.1.1. Auswahl der Studienpopulation	12
2.1.2. Klassifizierung nach Schweregrad der Atherosklerose.....	12
2.2. Histochemie und Charakterisierung der Plaque Morphologie	13
2.2.1. Anfertigung der Schnitte.....	13
2.2.2. Entparaffinierung.....	13
2.2.3. Hämatoxylin-Eosin (HE-) Färbung	13
2.2.4. Elastica-van-Gieson (EvG) Färbung.....	14
2.3. Immunhistochemie (IHC).....	14
2.3.1. Vorbehandlung der Präparate.....	14
2.3.2. Verwendete Antikörper.....	15
2.4. Mikroskopie, Digitalisierung und Auswertung der histologischen Präparate.....	16
2.5. Genexpressionsanalyse mittels quantitativer Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR).....	17
2.5.1. RNA-Extraktion	17
2.5.2. cDNA-Synthese.....	18
2.5.3. SYBR-Green basierte qRT-PCR	18

2.5.4. TaqMan basierte qRT-PCR.....	21
2.6. Western Blot	21
2.7. Statistische Auswertung.....	23
3. Ergebnisse.....	23
3.1. Auswertung der histologischen Charakterisierung der Studiengruppen (für beide Publikationen).....	23
3.2. Publikation I.....	24
3.3. Publikation II	25
4. Diskussion.....	27
4.1. Diskussion der verwendeten Methoden.....	27
4.1.1. IHC und semi-quantitative Auswertung der konsekutiven Färbungen	27
4.1.2. qRT-PCR zur Expressionsanalyse und Western Blot	28
4.2. Diskussion der Ergebnisse	28
4.2.1. Verminderte DNA-Methylierung bei Progression der Atherosklerose.....	28
4.2.2. Unterschiede in der Histonmethylierung in frühen und fortgeschrittenen atherosklerotischen Carotisläsionen	29
4.2.3. Vermehrte Histonacetylierung in fortgeschrittenen Stadien der Atherosklerose	31
5. Zusammenfassung.....	34
5.1. Publikation I.....	34
5.2. Publikation II	35
6. Literaturverzeichnis	37
7. Danksagung	43
8. Appendix	44
8.1. Publikation I.....	44
8.2. Publikation II	44

PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

1) Publikation I

Greißel A., Culmes M., Burgkart R., Zimmermann A., Eckstein H.-H., Zernecke A., Pelisek J. **Histone acetylation and methylation significantly change with severity of atherosclerosis in human carotid plaques.** *Cardiovascular Pathology* 2016 Mar-Apr; 25(2): 79-86.

2) Publikation II

Greißel A., Culmes M., Napieralski R., Wagner E., Gebhard H., Schmitt M., Zimmermann A., Eckstein H. H., Zernecke A., Pelisek, J. **Alternation of histone and DNA methylation in human atherosclerotic carotid plaques.** *Thrombosis and Haemostasis* 2015 Aug; 114(2): 390-402.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Arteria
Ac	Acetylierung
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ADP	Adenosindiphosphat
AHA	American Heart Association
APAAP	Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
bp	Basenpaare
CD	Cluster of Differentiation
DAB	Diaminobenzidin
cDNA	complementary DNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EC	Endothelial cell
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EvG	Elastica-van-Gieson
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
FFPE	Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HAT	Histonacetyltransferase
HDAC	Histon-Deacetylase
HE	Hämatoxylin-Eosin
HDL	High-Density-Lipoprotein
HMT	Histonmethyltransferase
HRP	horse raddish peroxidase
IHC	Immunhistochemie
LDL	Low-Density-Lipoprotein
LSAB	Labelled (Strept-)Avidin-Biotin-Methode
MMP	Matrixmetalloprotease
m-MuLV	Moloney Murine Leukemia Virus
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
OP	Operation
PCR	Polymerase Chain Reaction
qRT	real-time quantitative PCR
rpm	revolutions per minute

RT	Raumtemperatur
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
SDS	sodium lauryl sulfate (Natriumlaurylsulfat)
SMA	smooth muscle actin
SMC	smooth muscle cell
SM-MHC	smooth muscle-myosin heavy chain
TEA	Thrombendarteriektomie
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Ub	Ubiquitinylierung
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1
WHO	World Health Organization

1. EINLEITUNG

1.1 Atherosklerose

1.1.1 Definition, Epidemiologie, Risikofaktoren und Pathologie im Bereich der Carotisarterien

Laut WHO ist die Arteriosklerose als eine „(...) variable Kombination von Veränderungen der Arterien Intima, bestehend aus herdförmigen Ansammlungen von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalziumablagerungen, verbunden mit Veränderungen der Media in großen und mittleren elastischen und muskulären Arterien“ (World Health Organisation 1958) definiert. Der Begriff Atherosklerose wird oft synonym verwendet und betont die Ausbildung von „Atheromen“ (Lipideinlagerungen) in der Pathogenese.

Auf der WHO-Liste der 10 häufigsten Todesursachen weltweit nehmen ischämische Herzkrankheit und Schlaganfall die ersten beiden Plätze ein (WHO 2012). In beiden Fällen stellen atherosklerotische Gefäßveränderungen die führende Ursache dar. Somit ist die Bedeutung der Atherosklerose als eine der häufigsten Erkrankungen in den Industrienationen und zunehmend auch in Entwicklungs- und Schwellenländern immens (WHO 2002) (Rodriguez-Saldana et al. 2014).

In Autopsiestudien sowie prospektiven Studien (z.B. Prospective cardiovascular Münster Study PROCAM) (Solberg and Strong 1983, Assmann et al. 1998) wurden bestimmte Risikofaktoren bestätigt, die mit dem Auftreten von Atherosklerose in Gefäßen assoziiert sind: männliches Geschlecht, Lebensalter, Hypercholesterinämie (erhöhte LDL, erniedrigte HDL Spiegel), Raucherstatus, Übergewicht, Hypertonie, Diabetes mellitus, sowie positive Familienanamnese für kardiovaskuläre Erkrankungen (Solberg and Strong 1983, Strong et al. 1995, Assmann, Cullen et al. 1998). Weitere untersuchte Risikofaktoren sind Homocysteinämie (Homocysteine Studies 2002) und Depression (Tiemeier et al. 2004, Wattanakit et al. 2005).

In atherosklerotischen Arterien wird der Blutfluss durch die Einengung des Gefäßdurchmessers (Lumens) behindert. Im Bereich der Karotisgabel (Aufzweigung der

Arteria carotis communis in A. carotis interna und externa) kann es durch Ruptur der atheromatösen Plaques zur Verschleppung von thrombotischem Material in den Kreislauf kommen. Die Folge ist ein ischämischer Gefäßverschluss. Bis zu 20% der ischämisch bedingten Schlaganfälle werden durch atherosklerotische Veränderungen der extrakraniellen Hirngefäße hervorgerufen (Grau et al. 2001). Therapeutisch kann bei höhergradigen Stenosen der A. carotis zur Verbesserung der neurologischen Symptomatik die Thrombendarteriektomie (TEA) mit Patchplastik als Operationsmethode der Wahl durchgeführt werden (Shi et al. 2015). Die Proben für diese Studie wurden im Rahmen eines solchen Eingriffes gewonnen. Als Alternative steht für Patienten mit hohem perioperativem Risiko das interventionelle Carotis-Arterien-Stenting zur Verfügung. Findet die Durchführung durch erfahrene Hände in Zentren statt und werden individuelle Gegebenheiten des Patienten entsprechend berücksichtigt, liefern beide Verfahren ein ähnliches Outcome (Gahremanpour et al. 2012).

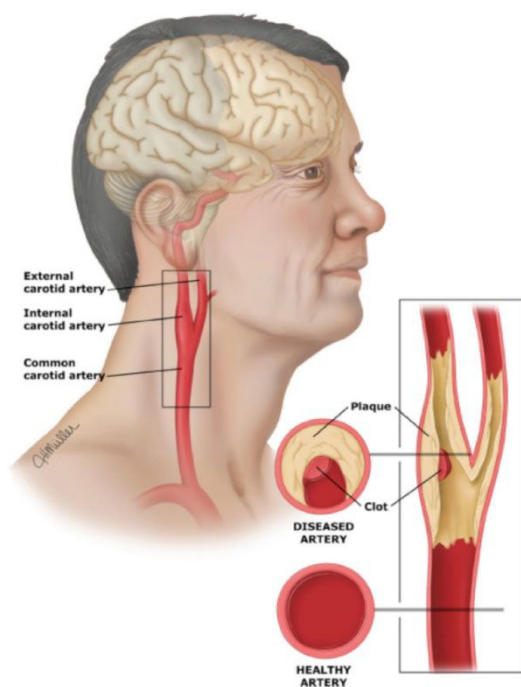


Abbildung 1 – Schematische Darstellung eines Plaques mit Thrombus im Bereich der Karotidgabel; Vom Thrombus ausgehend, werden Emboli in die Blutstrombahn geschwemmt, verschließen eine Arterie im Versorgungsgebiet der A. cerebri media und führen somit zum Hirninfarkt.

Quelle: (<http://www.victorianvascular.com.au/wp-content/uploads/2014/05/CAD.jpg>)

1.1.2. Pathogenese und histologische Klassifikation

Die Pathogenese der Atherosklerose ist komplex. Obwohl über die Jahre immer mehr molekulare Mechanismen entschlüsselt wurden, kann man alle Vorgänge noch nicht umfassend erklären. Initial besteht eine Endotheldysfunktion. Diese entsteht durch Scherbeanspruchung im Blutfluss (Hahn and Schwartz 2009), sowie dem Einfluss von metabolischen Faktoren und pro-inflammatorischen Mediatoren (Hansson 2005). In Folge exprimieren die Endothelzellen vermehrt Adhäsionsmoleküle (z.B. VCAM-1) (Cybulsky and Gimbrone 1991). Dadurch können Monozyten aus dem Blutstrom in die Gefäßwand einwandern und zu Makrophagen differenzieren. Diese Makrophagen nehmen über sogenannte Scavenger-Rezeptoren oxidierte LDL Partikel auf um sie abzubauen (Skalen et al. 2002). Kann das LDL bei Überangebot nicht mehr aus den Zellen mobilisiert werden, akkumulieren die Partikel und die Makrophagen werden zu Schaumzellen. Dies führt makroskopisch zunächst zu „fatty streaks“ und letztendlich zu der Ausbildung eines Lipidkerns. Im weiteren Verlauf kann dieser im Inneren nekrotisch werden (Hansson 2005). Durch die Migration von vaskulären glatten Muskelzellen (SMCs) von der Media in die Intima und deren Proliferation wird ein Plaque geformt. Die Begrenzung zum Lumen bildet eine fibröse Kappe, die durch die Produktion extrazellulärer Matrix durch die SMCs entsteht (Lim and Park 2014). Angezogen durch Chemokine wandern weitere inflammatorische Zellen (z.B. Lymphozyten, neutrophile Granulozyten) in die Gefäßwand ein. Im fortgeschrittenen Stadium kommt es zu Neovaskularisation, ausgehend von den Vasa vasorum der Adventitia (Ross 1993, Koole et al. 2012). Aus Hämorrhagien in den Kern können sich Thromben bilden, die sich bei weiterer Ausdünnung der fibrösen Kappe ablösen. Die Ausschwemmung thrombotischen Materials kann Gefäßverschlüsse zur Folge haben (Stary et al. 1995).

Unter Berücksichtigung der bekannten Pathomechanismen teilt die American Heart Association (AHA) die Atherosklerose in acht Stadien ein. Basierend auf der Arbeit von Stary et al. ergeben sich folgende Stadien der frühen (Typ I – III) und späten (Typ IV-VI) Atherosklerose, entsprechend der Histologie (Stary 1992, Stary et al. 1994, Stary, Chandler et al. 1995, Stary 2000):

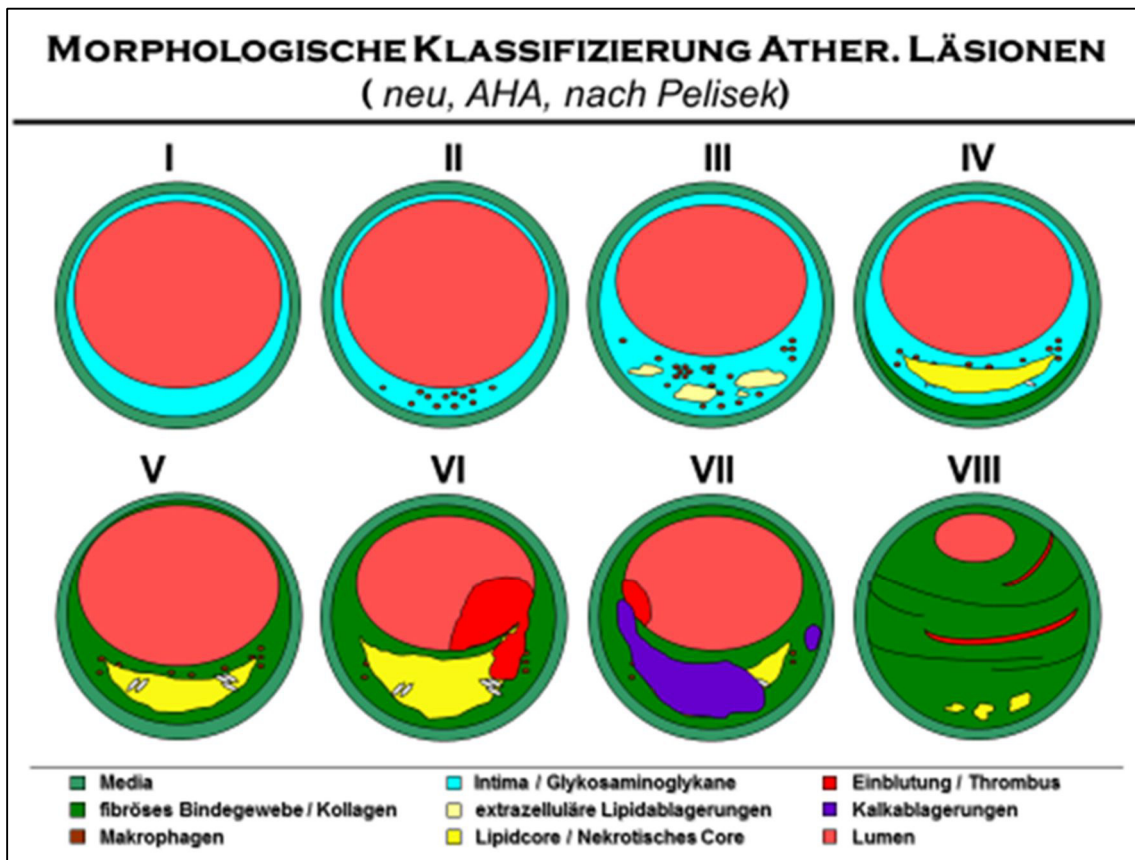


Abbildung 2- Schematische Darstellung der Stadien der Atheroskleroseentstehung; Beginn mit einer Verdickung der Intima, Einwanderung von Makrophagen und Einlagerung von extrazellulären Lipiden (Frühstadien I-III); Ausbildung eines Atheroms mit Lipidkern, Bildung einer fibrösen Kappe sowie Einblutungen und Thrombusbildung in den fortgeschrittenen Läsionen (IV-VI)

Quelle: (Stary H. C.; Natural History and Histological Classification of Atherosclerotic Lesions - An Update *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20:1177-1178); modifiziert nach Pelisek

1.2. Epigenetik

1.2.1. Epigenetik – ein kurzer Überblick

Die Definition des Begriffes Epigenetik hat sich über Jahrzehnte stetig weiterentwickelt. Erstmals definierte der britische Biologe Conrad Waddington den Begriff „The epigenotype“ im Jahr 1942. So bezeichnete er die Mechanismen, welche aus dem Genotyp unter Einfluss von Umweltfaktoren den Phänotyp eines Individuums entstehen lassen (Waddington 2012). Aktuell versteht man unter Epigenetik meiotisch und mitotisch vererbare Veränderungen der Genexpression, welche nicht in der DNA codiert sind. Neuere Definitionen betonen vor allem die Rolle der Epigenetik während der Entwicklung und Zelldifferenzierung komplexer Organismen unter Einfluss interner

und externer Faktoren (Jablonka and Lamb 2002, Szyf 2009, Whayne 2014). Die genetische Information ist im DNA-Strang kodiert und in jeder Zelle eines eukaryoten Organismus identisch. Damit sich Zellen differenzieren und unterschiedliche Funktionen ausführen können, werden jeweils nur bestimmte Regionen des Genoms exprimiert. Die Nukleinsäure ist im Zellkern an basische Proteine, so genannte Histone angelagert. Zusammen mit diesen bildet sie das Chromatin. Verdichtetes Chromatin bildet die Chromosomen. Die Kompaktheit des Chromatins kann durch biochemische Modifikationen gelockert oder verdichtet werden. Dementsprechend können Transkriptionsfaktoren vermehrt oder vermindert an die DNA binden. Dies stellt letztendlich eine Regulation der Genexpression dar (Fischle et al. 2003). Die regulatorischen Mechanismen können entweder direkte Modifikationen der DNA sein (z.B. DNA-Methylierung) oder posttranslationale Modifikationen der Histone (Huidobro et al. 2013). Im Folgenden werden diese beiden Mechanismen genauer erläutert, da sie in den beiden Publikationen untersucht wurden.

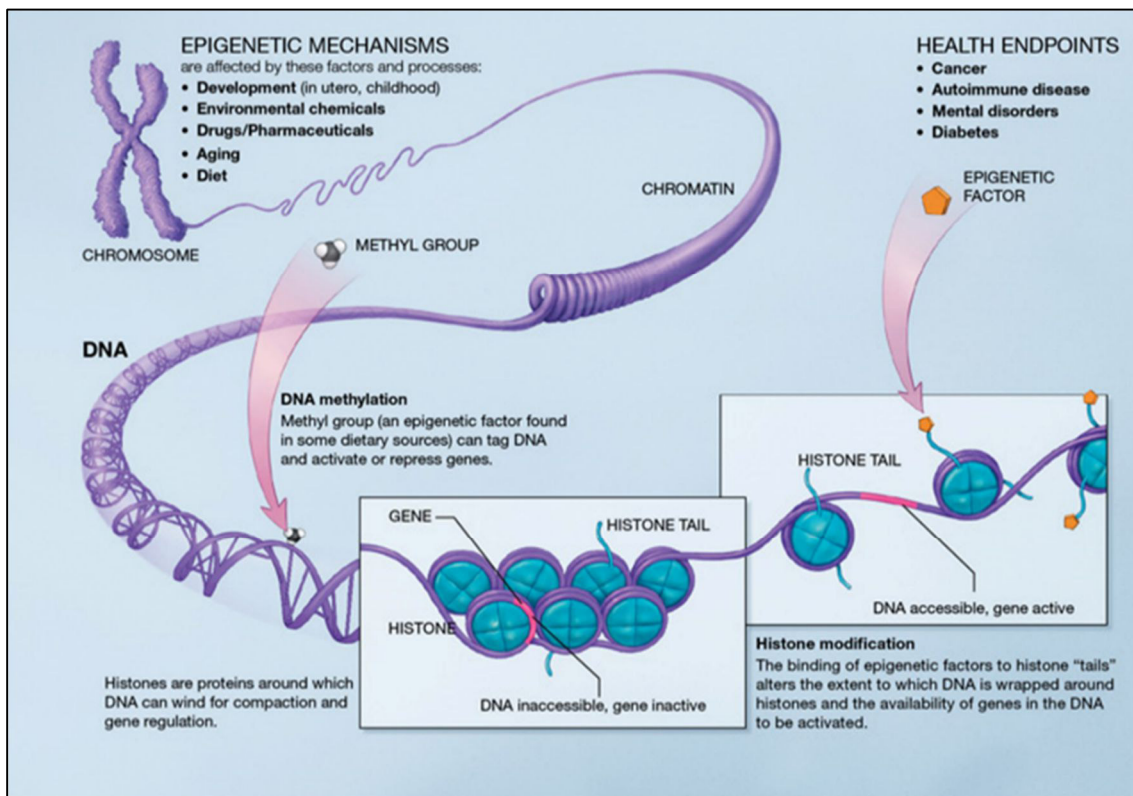


Abbildung 3 – Epigenetische Mechanismen und Aufbau des Erbguts; Quelle: (http://www.beginbeforebirth.org/wp-content/uploads/2011/03/Epigenetic_mechanisms.jpg)

1.2.1.1 DNA- und Histonmodifikationen

Die strukturelle Untereinheit des Chromatins ist das Nukleosom. Es besteht aus 147 bp DNA, die um ein Oktamer gewickelt ist. Dieses besteht aus jeweils zwei Kopien der Histone H2A, H2B, H3 und H4 (Insgesamt acht Histone). Histone werden durch das Anhängen funktionaler chemischer Gruppen an ihr N-terminales Ende modifiziert. Zur einheitlichen Beschreibung gilt eine bestimmte Nomenklatur. Abgekürzt wird immer zunächst das Histon genannt sowie die Position und Abkürzung der Aminosäure, die modifiziert wird: z.B. H3K4 bezeichnet das vierte Lysin (K) des Histons H3. Unter den möglichen Varianten der Modifikation finden sich Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung, Ubiquitinylierung und SUMOylierung (Santos-Rosa and Caldas 2005). Weitere Modifizierungen sind Desaminierung (Arginin zu Citrullin), ADP-Ribosilierung, Histon Prolin Isomerisierung sowie histone tail clipping (Bannister and Kouzarides 2011).

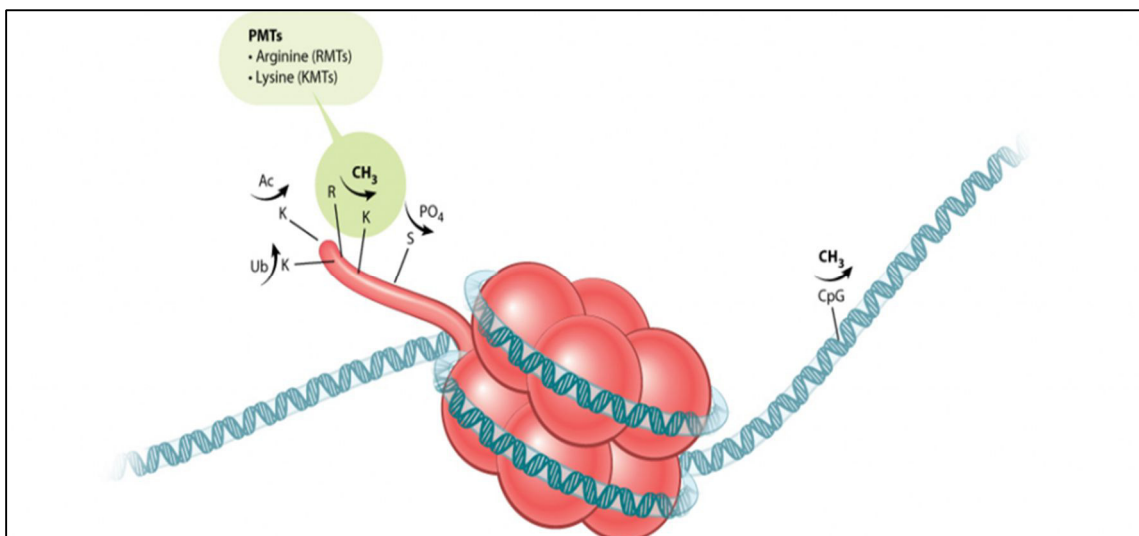


Abbildung 4 – Schematische Abbildung eines Nukleosoms mit möglichen post-translationalen Modifikationen (CH₃=Methylgruppe, Ac=Acetylierung, PO₄=Phosphorylierung, Ub=Ubiquitinylierung, K=Lysin, R=Arginin, S=Serin); Quelle: (<http://www.epizyme.com/epigenetics/about-epigenetics/chromatin-modifying-enzymes/>)

Im Folgenden werden die für die Publikationen wichtigen Mechanismen genauer beschrieben.

1.2.1.2 DNA-Methylierung

Einer der wichtigsten epigenetischen Mechanismen ist die DNA-Methylierung. Dabei werden bei Säugetieren di-Nukleotidpaare CpG (Cytosin und Guanin, p=Phosphat), durch das Anhängen von Methylgruppen an der Aminosäure Cytosin modifiziert (Razin and Riggs 1980). Es entsteht ein Methylierungsmuster welches spezifisch für das jeweilige Gen und Gewebe ist und somit Informationen über die spezifische Zellidentität enthält (Szyf 2009). Während die meisten CpG Regionen methyliert sind (60-80%), sind sogenannte CpG-Inseln der Promotorregionen frei von Methylierung. Die Methylierung dieser Regionen hätte eine Unterdrückung der Transkription zur Folge, wie es z.B. bei der Chromosom-X Inaktivierung oder dem genomischen Imprinting der Fall ist (Hernando-Herraez et al. 2015).

Die repetitiven Sequenzen LINE1 und Sat- α machen 11-17% der DNA aus und sind über das ganze Genom verteilt. Veränderungen dieser Regionen können daher als ein Maß für globale DNA-Methylierung dienen (Greissel et al. 2015).

Die Methylierung erfolgt durch die Enzymgruppe der DNA-Methyltransferasen (DNMT). Prinzipiell kann man die DNMT in drei Gruppen einteilen: DNMT1 erhält die bestehende Methylierung aufrecht. DNMT3A und DNMT3B sind vor allem für *de novo* Methylierung verantwortlich und spielen so eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Organismen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass DNMT3A und DNMT3B mit Änderungen von Histonmodifikationen korrelieren (Hiltunen et al. 2002, Wu and Zhang 2010, Choi et al. 2011). Ebenso wurden direkte Interaktionen zwischen DNA- und Histonmethyltransferasen nachgewiesen (Cedar and Bergman 2009).

1.2.1.3. Histonmethylierung

Histone werden an Seitenketten der Aminosäuren Lysin und Arginin methyliert. Dabei ändert sich die Ladung der Proteine nicht (Bannister and Kouzarides 2011). Spezifische Enzyme, Histonmethyltransferasen (HMTs) sind nur in der Lage bestimmte

Lysine zu methylieren. Zum Beispiel methyliert die HMT SUV39H1 ausschließlich H3K9 (Rea et al. 2000). Je nach Anzahl der angehängten Methylgruppen kann eine mono-, di- oder tri-Methylierung stattfinden. Die jeweiligen Enzyme sind auch in dieser Hinsicht spezifisch und nur in der Lage eine dieser Reaktionen zu katalysieren (Xiao et al. 2003).

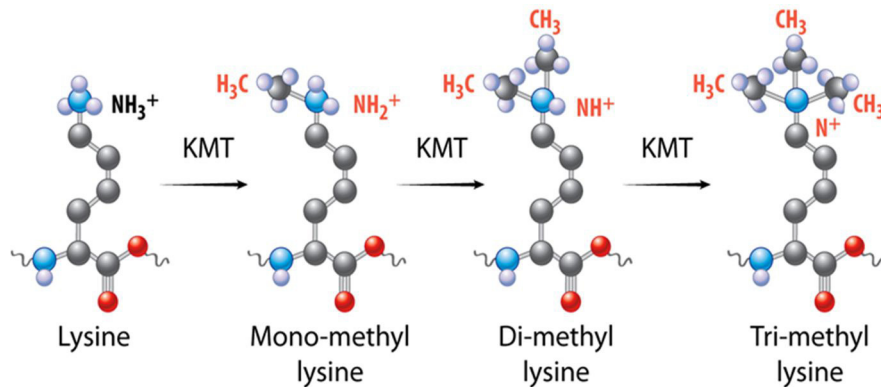


Abbildung 5 – Mono-/Di-/Trimethylierung der Aminosäure Lysin (HMT können in zwei Gruppen unterteilt werden: die Lysin-Methyltransferasen KMT und die Arginin-Methyltransferasen RMT; Da in dieser Arbeit nur KMT untersucht wurden, werden sie im Folgenden vereinfacht als HMT bezeichnet)

Quelle: (<http://www.epizyme.com/epigenetics/about-epigenetics/chromatin-modifying-enzymes/>)

Die Histonmodifikation ist nicht statisch, da die Methylgruppen von Histonmethylasen (HDMTs) wieder entfernt werden können (Klose and Zhang 2007). Besonders seit der Entdeckung der HDMT LSD1, die H3K4 demethyliert, sieht man den Prozess als reversibel an (Shi et al. 2004). Je nach Position der Methylierung werden Gene aktiviert oder inhibiert. Die Feinregulierung dieser Prozesse ist sehr komplex. Neben einer gegenseitigen Beeinflussung der Histonmodifikationen an den unterschiedlichen Aminosäuren, ist der Methylierungsstatus auch von der An-/Abwesenheit anderer Effektorproteine abhängig. Generell führt jedoch eine Methylierung von H3K4 zur Genaktivierung, die Methylierung von H3K9 und H3K27 zur Inhibierung der Genaktivität (Szyf 2009, Greer and Shi 2012).

1.2.1.4 Histonacetylierung

Im Gegensatz dazu führt Acetylierung immer zu einer vermehrten Transkription und somit zu Genaktivierung. Durch die Anlagerung der Acetylgruppen wird die positive Ladung der Lysine neutralisiert. Dadurch werden die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Histonen und den negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA gestört (Shahbazian and Grunstein 2007). Dies führt zur Auflockerung der Chromatinstruktur und somit zur vermehrten Bindung von Transkriptionsfaktoren. Die zugehörigen Enzyme, Histonacetyltransferasen (HATs) lassen sich in drei Hauptgruppen klassifizieren: GNAT, MYST und p300/CBP-Gruppe. Auch basale Transkriptionsfaktoren sowie Rezeptor Co-Faktoren im Zellkern gehören zu den HAT. Im Gegensatz zu HMTs, die immer spezifisch sind, folgen HAT globaleren Acetylierungsmustern (Roth et al. 2001). Histondeacetyltransferasen (HDACs) können die Acetyl-Gruppen wieder entfernen. HDAC-Inhibitoren, wie Valproinsäure oder FK228 wurden bereits in mehreren Studien als therapeutischer Ansatz für z.B. Krebserkrankungen erprobt (Hildmann et al. 2007, Baccarelli and Ghosh 2012).

1.2.2 Einfluss der Epigenetik auf die Atherosklerose – bisherige Studienlage

Epigenetische Prozesse stehen unter dem Einfluss von externen Faktoren (z.B. Umweltfaktoren, Ernährung etc.) (Whayne 2014). Daher werden sie immer öfter als Erklärungsansatz zum Verständnis von chronischen Krankheiten mit multifaktorieller Genese herangezogen. Besonders in Studien zu Krebserkrankungen und Therapieansätzen werden epigenetische Überlegungen seit Längerem miteinbezogen (Chi et al. 2010). Die Datenlage zu Epigenetik und kardiovaskulären Erkrankungen ist bisher noch unzureichend. Dennoch gibt es einige Arbeiten, die interessante Zusammenhänge zwischen Epigenetik und Atherosklerose erforscht haben (Dong et al. 2002, Castillo-Diaz et al. 2010, Ordovas and Smith 2010, Turunen and Yla-Herttuala 2011). So wurde beispielsweise gezeigt, dass abweichende DNA Methylierungsmuster mit einer Änderung der Transkription von proatherogenen Genen assoziiert sind (Castillo-Diaz, Garay-Sevilla et al. 2010). Außerdem werden Wachstum,

Differenzierung, Migration, Kontraktilität, Inflammation sowie Ablagerung extrazellulärer Matrix von SMCs durch die Aktivität von HATs und HDACs reguliert (Findeisen et al. 2011, Natarajan 2011). Erhöhte Inflammation als Resultat eines Endotheldefekts wurde bereits mit DNA Hypermethylierung assoziiert. Die vermehrte Rekrutierung von Entzündungszellen wird wiederum durch Acetylierung von Lysinen gesteuert (Schleithoff et al. 2012). Die Adhäsion der Monozyten an die Gefäßwand über VCAM-1 wird ebenfalls durch HAT Aktivität beeinflusst (Zhang et al. 2011). Ebenso wurde gezeigt, dass die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) durch Methylierung und Acetylierung von Histonen kontrolliert wird. Sie ist ein wichtiger Faktor für die Funktion des vaskulären Endothels (Mattagajasingh et al. 2007, Yan et al. 2010). Der bekannte Risikofaktor für Atherosklerose Homocystein führt zu einem intrazellulären Anstieg von S-Adenosylhomocystein. Da dieses wiederum ein Methyltransferase-Inhibitor ist, geht man von einem Zusammenhang mit epigenetischen Prozessen aus (Ingrosso and Perna 2009). Diverse epigenetische Prozesse scheinen also eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose einzunehmen.

Um ein genaueres Verständnis für die Pathomechanismen zu gewinnen und um potentielle neue Ansätze für Therapiemöglichkeiten zu schaffen, ist es notwendig epigenetische Überlegungen miteinzubeziehen. Die bekannten Risikofaktoren für die Entstehung von Atherosklerose (Rauchen, Cholesterin, etc.) können als Umwelteinflüsse betrachtet werden. Die Epigenetik beschreibt den vererbaren Einfluss von Umweltfaktoren auf das Genom eines Individuums. Daher können epigenetische Mechanismen gerade im Fall der Atherosklerose einen Erklärungsansatz für den Zusammenhang der Exposition gegenüber bestimmten Risikofaktoren und der Pathogenese darstellen. Im Bereich der Carotisarterienstenose ist es im Hinblick auf Therapieoptionen wichtig zu unterscheiden ob die Plaques stabil oder instabil sind. Hierfür ist ein umfassendes Verständnis der pathologischen Vorgänge in den atherosklerotischen Läsionen notwendig. Da die Datenlage über epigenetische Veränderungen und Progression der Atherosklerose in humanen Gefäßen bisher unzureichend ist, begründet sich die Notwendigkeit weiterer Studien auf diesem Gebiet.

1.3. Ziele der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden publikationsbasierten Dissertation war die Untersuchung der wichtigsten und am häufigsten beschriebenen epigenetischen Mechanismen, der DNA-Methylierung und der Histonmethylierung und -acetylierung in atherosklerotischen Läsionen von Patienten mit höhergradiger Carotisstenose. Die Arbeit fasst dabei zwei zu diesem Thema veröffentlichten Publikationen zusammen. Es wurde jeweils untersucht, ob es signifikante Unterschiede in den genannten epigenetischen Modifikationen zwischen Früh- und Spätstadium der Atherosklerose, bzw. gesunden Gefäßen gibt.

Folgende Fragen sollten beantwortet werden:

1. Gibt es Unterschiede in den Histonmodifikationen (Methylierung und Acetylierung) in atherosklerotischen Carotisläsionen verglichen mit gesunden Carotisgefäßen? Die Studie konzentriert sich hierbei auf die wichtigsten Positionen des Histons H3, nämlich K4, K9 und K27, die nachweisbar zur Veränderung der Chromatinstruktur führen.
2. Wie ist die Expression der zugehörigen Transferasen? Hier wurden Enzyme ausgewählt, die sich unter den als Erstes beschriebenen fanden (Santos-Rosa and Caldas 2005).
3. Bei welchen Zellen spielen die epigenetischen Veränderungen an Histonen die größte Rolle? Zellen, die an der Pathogenese der Atherosklerose beteiligt sind, wurden hinsichtlich der Histonmodifikationen miteinander verglichen.
4. Gibt es Unterschiede der DNA-Methylierung der repetitiven DNA-Sequenzen LINE-1 und Sat- α in fortgeschrittenen Stadien der Atherosklerose verglichen mit Anfangsstadien und gesunden Gefäßen?
5. Werden die Methyltransferasen DNMT1, 3A und 3B mit Progression der Atherosklerose unterschiedlich exprimiert

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Untersuchungsmaterial

2.1.1. Auswahl der Studienpopulation

Es wurden Gewebeproben (n=80: Publikation I und n=120: Publikation II) von Carotisarterien aus der Biobank der Klinik und Poliklinik für Vaskuläre und Endovaskuläre Chirurgie (Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München) untersucht. Die atherosklerotischen Plaques stammten von Patienten, die sich aufgrund einer hochgradigen Carotisstenose (Stenosegrad > 70%) einer Carotis-Thrombendarterektomie (TEA) unterzogen haben.

Als Negativkontrolle dienten gesunde Carotiden von 10 (Publikation I) bzw. 12 (Publikation II) Patienten, die im Rahmen von unfallchirurgischen Eingriffen gewonnen wurden. Die Durchführung der Studie erfolgte nach den Richtlinien der „Declaration of Helsinki“ der Weltgesundheitsorganisation (WHO).

2.1.2. Klassifizierung nach Schweregrad der Atherosklerose

Die aus den Operationen gewonnenen atherosklerotischen Plaques wurden in 4% Formaldehyd fixiert, in Blöcke von 4-5 mm segmentiert, entwässert und in Paraffin eingebettet. Bei starken Verkalkungen des Gewebes, wie sie im fortgeschrittenen Stadium des Atherosklerose Plaques vorkommen, ging eine zusätzliche Inkubation in EDTA Lösung (bis zu 7 Tage) voraus. Mittels Histochemie (siehe unten) konnten die Plaques in frühe und fortgeschrittene Stadien der Atherosklerose nach Sary et al. (Sary, Chandler et al. 1994, Sary, Chandler et al. 1995, Sary 2000) klassifiziert werden. Nach dieser von der AHA anerkannten Methode, wurden die Gewebeproben in zwei Gruppen eingeteilt: Frühstadium I - III („early stage“) und Spätstadium V-VII („advanced stage“) der Atherosklerose. Stadium IV und VIII wurde aus der Studie ausgeschlossen, weil nur wenige Carotisläsionen diesen Typ der Atherosklerose innehatten. Die Klassifizierung erfolgte in enger Absprache mit einem erfahrenen Pathologen.

2.2. Histochemie und Charakterisierung der Plaque Morphologie

2.2.1. Anfertigung der Schnitte

Aus den in Paraffin eingebetteten und mit Formalin fixierten Gefäßproben (A.carotis) wurden mit dem Mikrotom 2-3 µm dünne Schnitte angefertigt, kurz zur „Entfaltung“ in ein 40°C Wasserbecken gebracht, auf einen Glasobjektträger (SuperFrost, Firma Menzel, Deutschland) aufgezogen und bei 56°C über Nacht getrocknet. Um die Adhäsion zu verbessern wurden die Objektträger zuvor mit poly-L-lysine solution (0.1% v/w in water, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) beschichtet.

2.2.2. Entparaffinierung

Vor dem Färbevorgang wurden die getrockneten Präparate durch 20 minütige (min) Inkubation in Xylol entparaffiniert und anschließend mittels absteigender Alkoholreihe bis zu destilliertem Wasser (Aqua dest) rehydriert: 10 min in 100 % Isopropanol, 5 Minuten in 96% Ethanol, 5 Minuten in 70% Ethanol und zuletzt in Aqua dest. Alle benötigten Substanzen wurden aus der Apotheke des Klinikum rechts der Isar bezogen.

2.2.3. Hämatoxylin-Eosin (HE-) Färbung

Die HE-Färbung diente als Standard und Übersichtsfärbung. Zellkerne erscheinen bei dieser Färbung blau, das Zytoplasma rosa. Die Färbung erfolgte nach einem Standardprotokoll des Instituts für Pathologie, Klinikum rechts der Isar.

Nach Entparaffinierung erfolgte eine 10 minütige Inkubation mit Mayer's Hämalaun bei Raumtemperatur (RT). Durch anschließende Spülung in alkalischem Milieu (warmes Leitungswasser) für wurden basophile Strukturen (DNA, Ribosomen) blau gefärbt. Danach wurden basische Zytoplasmaproteine mit 2%-igem Eosin (Zugabe von Essigsäure damit pH=4-6) für 1 min rot gegengefärbt. Anschließend wurde kurz mit Leitungswasser gespült, in aufsteigender Alkoholreihe (70%Ethanol, 96% Ethanol, 100% Isopropanol) entwässert, mit Xylol geklärt und mit Deckgläschen eingedeckt.

2.2.4. Elastica-van-Gieson (EvG) Färbung

Mithilfe dieser Färbung können kollagene und elastische Fasern gut differenziert werden. Die entparaffinierten und entwässerten Präparate wurden für 15 min mit einer Resorcin-Fuchsin-Lösung inkubiert um elastische Fasern schwarz darzustellen. Nach einem Spülgang mit Aqua dest, erfolgte eine kurze Inkubation in 96% Ethanol.

Die schwarz-braune Anfärbung der Kerne wurde durch anschließendes Einbringen der Präparate in Eisenhämatoxylinlösung nach Weigert für 5 min erzielt. Danach werden die Schnitte für 10 min warm gewässert und im Anschluss wird das Zytoplasma mit Pikrofuchsin für 5 min gegengefärbt. Die Pikrinsäure stellt fast alle Strukturen gelb dar. Das Säurefuchsin kann wegen der kurzen Einwirkzeit nur in Kollagenfasern eindringen und färbt diese rot. Entwässern und Eindecken erfolgt wie oben erwähnt.

2.3. Immunhistochemie (IHC)

2.3.1. Vorbehandlung der Präparate

Die in Formaldehyd fixierten Paraffinpräparate (FFPE) wurden zunächst wie oben beschrieben mit dem Mikrotom 2µm dünn geschnitten, auf beschichtete Objektträger aufgezogen, bei 56 °C getrocknet und entparaffiniert.

Zur Proteindemaskierung wurden die Präparate 7 min in Citratpuffer (pH=6; 2,1 g Citrat-Monohydrat in 1000 ml Aqua dest) gekocht. Anschließend erfolgte die Spülung aller Schnitte mit einer 10-fachen Verdünnung von TRIS Puffer. TRIS Puffer wurde aus 60,5 g Trizma Base (Sigma-Aldrich, Germany) und 90 g NaCl (Merck, Germany) in 1000 ml Aqua dest hergestellt. Durch Hinzugabe von HCl (Apotheke des Klinikums rechts der Isar, TU München, Germany) wurde der pH auf 7,6 eingestellt.

Für die immunhistochemische Färbung kamen die LSAB und APAAP Methode zum Einsatz. Dafür wurden Dako REAL™ Detection System APAAP Mouse (Dako Denmark A/S, Glostrup Denmark) und Dako REAL™ Peroxidase/DAB+ Rabbit/Mouse (Dako Denmark A/S, Glostrup Denmark) gemäß Anweisungen des Herstellers verwendet. Alle Antikörper wurden mit Antibody Diluent (Dako) verdünnt.

Es folgten mehrmalige Inkubations- und Spülungsschritte gemäß Protokoll des Herstellers. Zuletzt ließ sich unter dem Lichtmikroskop die Farbentwicklung (braun bzw. rot) beobachten. Nach einem letzten Spülen mit TRIS-Puffer wurden die Präparate für ca. 20 sec mit Hämalaun gegengefärbt. Anschließend aufsteigende Alkoholreihe, Xylol und Eindecken der Objektträger.

2.3.2. Verwendete Antikörper

Mithilfe der Immunhistochemie konnten Endothelzellen, Lymphozyten, Makrophagen und glatte Muskelzellen (SMCs) im Früh- und Spätstadium der Atherosklerose differenziert werden. Anschließend wurden konsekutive Schnitte der Präparate mit Antikörpern gegen methylierte (H3K4me, H3K9me, H3K27me) und acetylierte (H3K9ac, H3K27ac) Histone gefärbt. Eine Übersicht der verwendeten Antikörper und Verdünnungen finden sich in nachfolgenden Tabellen.

Für die Darstellung glatter Muskelzellen wurden drei verschiedene Antikörper getestet und letztendlich anti smooth muscle actin (SMA) verwendet (siehe Tabelle). Ebenfalls getestet wurden die Antikörper gegen smooth muscle myosin heavy chain 1 und 2 (SM-MHC1+2, rabbit monoclonal, Verdünnung 1:4,000; abcam; Cat. ab124679) und smoothelin (mouse monoclonal, diluton 1:100; abcam; Cat. ab21108).

Tabelle 1 – Antikörper für IHC

Antikörper	Spezifität	Tierart	Klon	Verdünnung	Methode	Hersteller
Anti-human CD31	Endothelzellen	Mouse monoclonal	JC7OA	1:100	LSAB	Dako, Glostrup, Denmark
Anti-human CD45 common leukocyte antigen	Lymphozyten	Mouse monoclonal	2B11 + PD7126	1:200	LSAB	Dako, Glostrup, Denmark
Anti-CD68	Makrophagen	Mouse monoclonal	KP1	1:2000	LSAB	Dako, Glostrup, Denmark
Anti-smooth muscle actine (SMA)	Glatte Muskelzellen	Mouse monoclonal	HHF35	1:200	APAAP	Dako, Glostrup, Denmark

Tabelle 2 – Antikörper für IHC (Histonmethylierung)

Antikörper	Tierart	Klon	Verdünnung	Methode	Hersteller
di-methyl-histone H3 (Lys 4)	Rabbit monoclonal	C64G9	1:3000	LSAB	Cell Signalling Technology Inc., Danvers, USA
di-methyl-histone H3 (Lys 9)	Polyclonal; source: rabbit	-	1:200	LSAB	Cell Signalling Technology Inc., Danvers, USA
di-methyl-histone H3 (Lys 27)	Rabbit monoclonal	(D18C8)XP	1:1000	LSAB	Cell Signalling Technology Inc., Danvers, USA

Tabelle 3 – Antikörper für IHC (Histonacetylierung)

Antikörper	Tierart	Klon	Verdünnung	Methode	Hersteller
anti-Histone H3 (acetylK27)	Rabbit monoclonal	[EP8654] (ab45173)	1:4000	LSAB	Abcam, Cambridge, UK
anti-Histone H3 (acetylK9)	Rabbit monoclonal	[Y28] (ab32129)	1:2000	LSAB	Abcam, Cambridge, UK

2.4. Mikroskopie, Digitalisierung und Auswertung der histologischen Präparate

Zur histologischen Charakterisierung wurden die Präparate mit dem Lichtmikroskop (Axioplan 2, Carl-Zeiss, Institut für Pathologie TU München) untersucht. Zur Einschätzung der Plaquemorphologie und der Einstufung in die Schweregrade der Atherosklerose wurden die Zellularität, Grad der Verkalkung, Thrombosierung und Haemorrhagien, Ausbildung von Neogefäßen sowie Gehalt an SMCs, Makrophagen und Kollagen beurteilt. Die konsekutiven Schnitte wurden mit Aperio Scanscope CS2 (Leica Biosystems Nussloch GmbH) eingescannt und digital abgespeichert, um eine übersichtlichere Auswertung am Monitor zu ermöglichen. Die Intensität der einzelnen Färbungen wurde in den individuellen Zellen innerhalb der atherosklerotischen Plaques konsekutiv (der Reihe nach) für SMCs, Makrophagen, Lymphozyten sowie für H3K4me,

H3K9me, H3K27me, H3K9ac und H3K27ac untersucht. Es erfolgte die Auswertung mittels eines semi-quantitativen Scorings durch den Promotionsstudenten und den Betreuer der experimentellen Arbeit PD Dr. Pelisek.

2.5. Genexpressionsanalyse mittels quantitativer Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

2.5.1. RNA-Extraktion

Um die Aktivität der DNMTs, HMTs und HATs zu bestimmen, wurde deren Expression mittels qRT-PCR untersucht. Dies ist als ein zweistufiger Prozess anzusehen.

In einem ersten Schritt musste die RNA aus den FFPE Carotispräparaten extrahiert werden. Hierbei kam das High Pure RNA Paraffin Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) zur Verwendung. Während des gesamten Vorgangs wurde auf RNase-freie Bedingungen geachtet (RNase-Zap, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim Germany), um die empfindliche RNA vor Abbau zu schützen.

Pro Präparat wurden zwei Schnitte von 10 µm mit dem Mikrotom angefertigt und direkt in ein steriles 1,5 ml Eppendorf Gefäß übertragen. Vorher wurde die Paraffinmenge durch seitliches Abschneiden am Präparat reduziert. Dies erleichterte die folgende Entparaffinierung durch eine 5-minütige Inkubation in 800 µl Xylol.

Um eine Analyse der Expression von HMTs selektiv für die einzelnen Zelltypen durchzuführen, wurde zusätzlich die Technik der Mikrodissektion unter dem Lichtmikroskop angewandt. Hierbei wurden aus ausgewählten Präparaten jeweils nur Bereiche mit dem Skalpell ausgeschnitten, die die gesuchten Zellen beinhalten.

Folgende Binde-/Zentrifugations- und Waschschrte erfolgten nach Protokoll des Herstellers unter Einhaltung der vorgegebenen Inkubationszeiten.

Nach dem letzten Schritt verblieben 60 µl Gesamtvolumen im Eppendorfgefäß (1,5 ml). Der reine RNA Gehalt dieser Lösung wurde mit Nanodrop 2000c (Peqlab GmbH) photometrisch bestimmt und die Proben im Anschluss bei -70°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

2.5.2. cDNA-Synthese

Da für die anschließende PCR DNA benötigt wird, musste die aus den FFPE Präparaten gewonnene RNA im zweiten Schritt, in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Dies wurde mit dem RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Kat.No. K1622) durchgeführt. In einem Gesamtvolumen von 11 μl wurde bis zu 1 μg RNA umgewandelt. Nach Zugabe von 1 μl Oligo (dT₁₈) Primern, wurde die Probe kurz gemixt, anzentrifugiert und zur besseren RNA-Entfaltung 5 min bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben unmittelbar auf Eis gelagert und dort 2 min inkubiert. In der Zwischenzeit wurde auf Eis ein Mix hergestellt, der Folgendes beinhaltet: 4 μl Puffer, 1 μl RNase Inhibitor, 2 μl dNTP (Desoxyribonukleosid-triphosphate) (10 mM) und 1 μl M-MuLV Reverse Transkriptase. Von diesem Mix wurden 8 μl zu jeder Probe gegeben, gefolgt von 1 Stunde Inkubationszeit bei 43°C. Das Temperaturoptimum des Enzyms M-MuLV Reverse Transkriptase liegt zwischen 42°C und 50°C. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Reaktion für 5 min bei 70 °C gestoppt und die Proben bei -20°C eingefroren.

2.5.3. SYBR-Green basierte qRT-PCR

Bei der real-time PCR zur Quantifizierung der Expression von DNMTs, HMTs und HATs wurde SYBR-Green I (KAPA SYBR Fast Universal, peqlab) und kommerziell erhältliche Primer (Qiagen) (siehe Tabellen) verwendet. Der Cyanin-Farbstoff bindet an doppelsträngige DNA und emittiert grünes Licht. Die Reaktion fand im Thermo Cycling Gerät (iQ5 real-time Cyler, Biorad) statt, welches das emittierte Signal detektiert.

PCR-Ansatz (Gesamtmenge 25 μl):

Komponente	Menge
SYBR-Green-MasterMix (peqlab)	12,5 μl
PCR-Wasser (steril)	8,5 μl
Primer Assay	2 μl
cDNA	2 μl

Tabelle 4 - Primer qRT-PCR – Referenzgen

Gen	Primer	Amplikon (bp)	Cat. Nr.
GAPDH	QuantiTect Primer Assay Hs_GAPDH_1_SG, NM_001256799	95	QT00079247

Tabelle 5 - Primer qRT-PCR - H3K4

Gen	Primer	Amplikon (bp)	Cat. Nr.
MLL2	QuantiTect Primer Assay Hs_MLL_2_SG	76	QT00247464
hSET1A	QuantiTect Primer Assay Hs_KIAA0339_1_SG	74	QT00042427
SET7/9	QuantiTect Primer Assay Hs_SET7_1_SG	163	QT00079282

Tabelle 6 - Primer qRT-PCR – H3K9

Gen	Primer	Amplikon (bp)	Cat. Nr.
SUV39H1	QuantiTect Primer Assay Hs_SUV39H1_1_SG	108	QT00091042
SUV39H2	QuantiTect Primer Assay Hs_SUV39H2_1_SG	106	QT00094311
ESET/SET DB1	QuantiTect Primer Assay Hs_SETDB1_1_SG	110	QT00086142
EHMT1	QuantiTect Primer Assay Hs_EHMT1_1_SG	110	QT00084602

Tabelle 7 - Primer qRT-PCR – H3K27

Gen	Primer	Amplikon (bp)	Cat. Nr.
EZH1	QuantiTect Primer Assay Hs_EZH1_1_SG	91	QT00030275
EZH2	QuantiTect Primer Assay Hs_EZH2_1_SG	112	QT00054614
G9a	QuantiTect Primer Assay Hs_EHMT2_1_SG	97	QT00088627

Tabelle 8 – Primer qRT-PCR- Acetylierung

Gen	Primer	Amplikon (bp)	Cat. Nr.
GCN5L	QuantiTect Primer Assay Hs_KAT2A_1_SG	88	QT00067704
P300	QuantiTect Primer Assay Hs_EP300_1_SG	72	QT00094500
MYST1	QuantiTect Primer Assay Hs_KAT8_1_SG	94	QT00090636
MYST2	QuantiTect Primer Assay Hs_KAT7_1_SG	78	QT00006132

Tabelle 9 – Primer qRT-PCR DNA-Methyltransferasen

Gen	Primer	Amplikon (bp)	Cat. Nr.
DNMT1	QuantiTect Primer Assay Hs_DNMT1_1_SG	93	QT00034335
DNMT3A	QuantiTect Primer Assay Hs_DNMT3A_1_SG	144	QT00090832
DNMT3B	QuantiTect Primer Assay Hs_DNMT3B_1_SG	128	QT00032067
TET1	QuantiTect Primer Assay Hs_TET1_1_SG	88	QT00037646

Während der Herstellung des Ansatzes wurden die Proben auf Eis gelagert um eine Fragmentierung der empfindlichen cDNA zu verhindern. Anschließend wurde der Ansatz für den jeweiligen Primer steril in eine 96-Well Platte (Sarstedt) pipettiert. Alle Proben wurden in Doppelbestimmung gemessen. Für Einstellung, Steuerung und Auswertung kam die StepOnePlus Software (Applied Biosystems) zum Einsatz.

Grundsätzlich erfolgt die PCR in drei Schritten, die sich zyklisch wiederholen. Die Temperaturen und Zeiten, für die hier verwendeten Primer und Enzyme optimiert und gemäß folgendem Protokoll durchgeführt:

PCR-Reaktion	Temperatur	Zeit
1. Denaturierung	95	5 min.
	95	10 sec.
2. Primer annealing	60	30 sec.
3. Amplifikation	72	10 sec.
4. Eliminierung der Primer Dimere	77	15 sec.
Zykluszahl Gesamt	45	

Bei dieser Methode kann es auch zu einer unspezifischen Anlagerung der Primer kommen (sog. Primer-Dimere). Deshalb wurde im letzten Schritt die Temperatur über den Schmelzpunkt der Primer-Dimere angehoben, womit diese eliminiert werden. Es folgte die Auswertung mittels Schmelzkurvenanalyse. Da die Primer-Dimere einen unterschiedlichen Schmelzpunkt (T_m = Temperatur, bei der 50 % der Basenpaare des DNA Doppelstrangs getrennt sind) haben als die gesuchten Amplicons, können die Kurven unterschieden werden. Jeder Primer wiederum hat ebenfalls seinen spezifischen

Schmelzpunkt T_m . Für die Auswertung wurde die ABI Prism 7700 Sequence Detector Software (Applied Biosystems) verwendet.

Bei der qRT-PCR handelt es sich nicht um eine absolute sondern eine relative Quantifizierung der Genexpression. Bei jeder PCR-Reaktion wurde deshalb die Expression des „housekeeping genes“ Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) mitbestimmt und die Expression der Zielgene in Relation dazu gesetzt. Alle verwendeten Primer Assays stammen von Qiagen (Hilden, Germany).

2.5.4. TaqMan basierte qRT-PCR

Für die Quantifizierung der DNA-Methylierung, wurde zunächst DNA aus den konsekutiven FFPE Proben extrahiert. Anschließend erfolgte die Bisulfit-Konversion um unmethylierte Cytosine in Uracil umzuwandeln. Dies erfolgte nach Herstellerangaben (Quiagen, Hilden, Germany). Die DNA Methylierung wurde dann anhand der repetitiven Sequenzen LINE1 und SAT- α (Methylight System) mittels TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) quantifiziert. Wie durch Weisenberger et al. etabliert, diente die methylierungsunabhängige repetitive DNA-Sequenz ALU1 als Referenzgen (Weisenberger et al. 2008). Die Primer wurden für den ABI Prism Sequence Detector (Applied Biosystems) optimiert.

2.6. Western Blot

Die Methylierung der Histone wurde zusätzlich auf Proteinebene mittels Western Blot untersucht. Dabei wurde die Expression von methyliertem H3K4, H3K9 und H3K27 mit der Expression von gesamten Histon H3 verglichen.

Segmente aus FFPE Carotispräparaten wurden in flüssigem Stickstoff homogenisiert, in Lysepuffer aufgelöst und die Histone nach Herstellerangaben extrahiert (EpiSeeker Histone Extraction Kit, Abcam, Cambridge, UK). Die Proteinquantifizierung erfolgte durch Auswertung der optischen Dichte bei 560 nm mittels BCA Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology, Rockford, USA). Jeweils gleiche Anteile der extrahierten

Histonproteine wurden dann mit 15% SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF Membran gebロットet. Die Membran wurde für 1 Stunde mit 5% fettfreier trockener Milch in TBS-Lösung geblockt (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl) und anschließend mit Primärantikörpern über Nacht bei 4°C inkubiert (Tabelle 9). Es folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper für 1 Stunde (goat anti-rabbit IgG, TR-001-HR, Thermo Scientific; Verdünnung 1:10,000). Die Proteine wurden mittels Chemilumineszenz visualisiert (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific, Waltham, USA). Die Quantifizierung wurde durch Analyse der Intensität der einzelnen Banden mit free software ImageJ 1.44p (National Institutes of Health, USA) durchgeführt.

Tabelle 9 - Primärantikörper Western Blot

Antikörper	Tierart	Cat. Nr.	Verdünnung	Hersteller
Di-Methyl-Histone H3 (Lys4)	rabbit monoclonal	9847S	1:500	Methyl-Histone H3 Antibody Sampler Kit; New England Biolabs Frankfurt am Main, Germany;
Di-Methyl-Histone H3 (Lys9)	rabbit monoclonal	9847S	1:500	Methyl-Histone H3 Antibody Sampler Kit; New England Biolabs Frankfurt am Main, Germany;
Di-Methyl-Histone H3 (Lys 27)	rabbit monoclonal	9847S	1:500	Methyl-Histone H3 Antibody Sampler Kit; New England Biolabs Frankfurt am Main, Germany;
Histone H3	rabbit monoclonal	9847S	1:500	Methyl-Histone H3 Antibody Sampler Kit; New England Biolabs Frankfurt am Main, Germany;

2.7. Statistische Auswertung

Alle Ergebnisse wurden mit SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) ausgewertet.

Die Daten werden mittels Boxplot Diagramm mit Median und 25./75.Perzentile dargestellt. Unterschiede mit p-Wert < 0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen.

Für die detaillierte Beschreibung wird auf die Publikationen im Appendix verwiesen.

3. ERGEBNISSE

3.1. Auswertung der histologischen Charakterisierung der Studiengruppen (für beide Publikationen)

Für beide Veröffentlichungen wurden die Carotispräparate zunächst in die Studiengruppen Kontrollen, Früh- und Spätstadium der Atherosklerose eingeteilt. Anhand der histologischen Klassifizierung ergaben sich folgende Ergebnisse.

In den Frühstadien I – III zeigte sich in den Gefäßen eine Zunahme von fibrösem Bindegewebe. Durch Ablagerung von Kollagen sowie Glycosaminoglykanen erschien die Intima verdickt. Innerhalb der Intima fanden sich vereinzelt Lipidansammlungen. Die Anzahl von Makrophagen war im Gegensatz zu Kontrollgefäßen erhöht.

Im Spätstadium IV-VII konnte ein weiterer Anstieg von Leukozyten und Makrophagen beobachtet werden. Fibröses Bindegewebe war heterogen durch alle Gefäßschichten verteilt. Es fanden sich thrombotische Ablagerungen, die in einigen Fällen auch Haemorrhagien aufwiesen. Neben größer gewordenen Lipideinlagerungen, dominierten Nekrosen und Kalzifikationen die Gefäßwand.

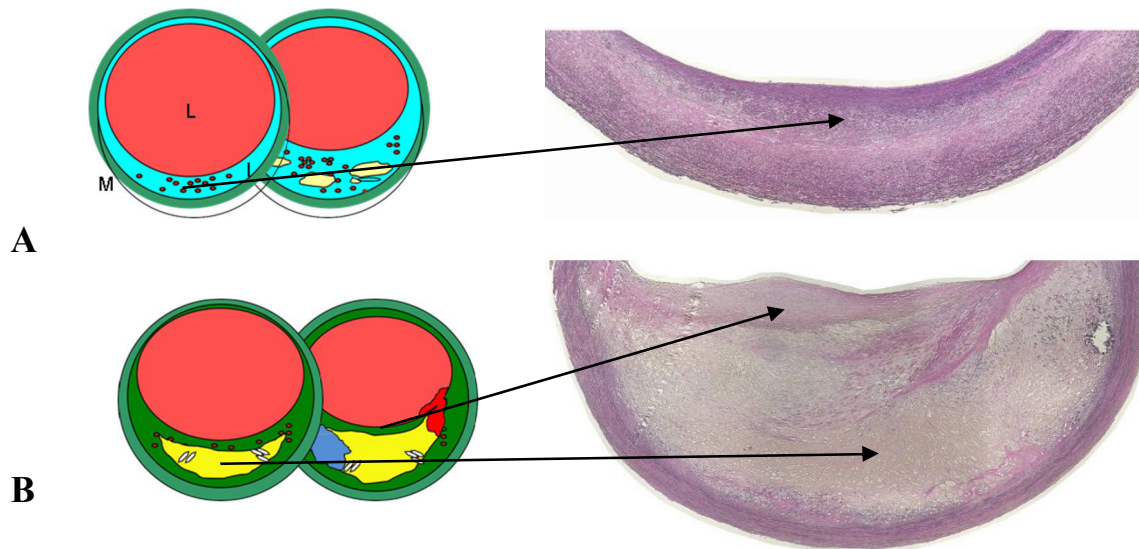


Abbildung 6 – Schematische Darstellung der Atherosklerose im Frühstadium (A) und Spätstadium (B) nach Stary et al. mit entsprechenden histologischen Präparaten (HE-Färbung); Die Pfeile markieren sichtbare Pathologien: Verdickung der Intima, Ausbildung einer fibrösen Kappe und nekrotische Lipideinlagerungen (von oben nach unten)

3.2. Publikation I

Zum Zeitpunkt der Planung der ersten experimentellen Ansätze gab es noch keine Daten über die möglichen epigenetischen Veränderungen in atherosklerotischen Läsionen von Patienten mit höhergradigen Carotisstenose. Daher wurde der Fokus zuerst auf die Histonacetylierung und –methylierung gelegt (Publikation I). Zu diesem Zweck wurde mittels IHC die Ausprägung der Histonmethylierung und der Histonacetylierung von H3K4, H3K9 und H3K27 untersucht. Anschließend erfolgte die Analyse der Expression ausgewählter HMTs (H3K4: MLL2/4, SET7/9, hSET1A; H3K9: SUV39H1, SUV39H2, ESET/SETDB1, EHMT1; H3K27: EZH2, G9a), sowie HATs (GNAT-Gruppe: GCN5L, P300/CBP-Gruppe: P300, MYST-Gruppe: MYST1, MYST2) mittels SYBR-Green basierter qRT-PCR.

Da die Position K4 nicht acetyliert wird, wurden für die Acetylierung nur H3K9 und H3K27 analysiert. Für alle Präparate wurde eine konsekutive Färbung der einzelnen Zelltypen durchgeführt, gefolgt von einer acetylierungsspezifischen IHC. Erhöhte Histonacetylierung von H3K9 und H3K27 wurde in SMCs und in Makrophagen in fortgeschrittenen Läsionen beobachtet, verglichen mit gesunden Kontrollen (siehe *Figure*

1 und 2 (Publikation I)). Die Acetylierung von H3K9 korrelierte mit Plaque Progression (siehe *Figure 2* (Publikation I)).

Die Expression der HATs GCN5L und MYST1 wies einen signifikanten Zusammenhang zur Schwere der Atherosklerose auf. Die Expressionsunterschiede von p300 waren nicht signifikant, während MYST2 in keiner Probe detektiert wurde (siehe *Figure 3* (Publikation I)).

H3K9 war in fortgeschrittenen Atherosklerosestadien in SMCs und Leukozyten signifikant weniger methyliert. Für H3K27 zeigte sich ebenfalls eine signifikante Reduktion der Methylierung in fortgeschrittenen Stadien in Makrophagen und Leukozyten. Im Gegensatz dazu war die Methylierung von H3K4 besonders in SMC und Endothelzellen in fortgeschrittenen Atherosklerosestadien signifikant erhöht (siehe *Figure 4* (Publikation I)).

Die Histonmethyltransferase MLL2/4, die H3K4 methyliert, zeigte eine signifikante Erhöhung der Expression in fortgeschrittenen Carotisplaques. Außerdem konnte G9a detektiert werden, jedoch ohne signifikante Unterschiede in den Studiengruppen (siehe *Figure 5* (Publikation I)). Für die übrigen Enzyme konnte keine Expression nachgewiesen werden. Interessanterweise waren die Expressionslevel von MLL2/4 und G9a 100-1000-fach höher als die Expression der HATs. Sie erreichten ein ähnliches Level wie das „housekeeping“-Gen GAPDH.

Die Ergebnisse dieser Studie weisen auf einen entscheidenden Zusammenhang zwischen Histonmodifikationen und Atheroskleroseentstehung hin. Die Veränderungen scheinen vor allem zu einer erhöhten Genaktivität zu führen. Für eine detaillierte und vollständige Darstellung der Ergebnisse findet sich die Publikation I im Appendix.

3.3. Publikation II

Aufgrund der vielversprechenden Resultate der ersten Publikation wurde im zweiten Teil der Dissertation detaillierter auf die Histonmethylierung eingegangen. Zusätzlich wurden die DNA-Methylierung und die Expression der korrespondierenden DNA-Methyltransferasen untersucht.

Die Methylierung der Histone wurde zusätzlich mittels Western Blot analysiert. Die Methylierung von H3 an den Positionen K4, K9 und K27 wurde mit der Expression von Histon H3 als Ganzes verglichen. H3K9 und H3K27 in frühen und fortgeschrittenen Stadien der Atherosklerose zeigten eine bis zu 4-fache Reduktion der Methylierung, verglichen mit den gesunden Kontrollen (siehe *Figure 1* (Publikation II)).

Immunohistochemisch war die Methylierung von H3K9 und H3K27 insbesondere in glatten Muskelzellen (SMCs) und Lymphozyten in fortgeschrittenen Stadien der Atherosklerose auch signifikant reduziert (siehe *Figure 3 und 4* (Publikation II)). Da Methylierung dieser Positionen zu einer verminderten Genaktivität führt, bedeutet die Reduktion eine vermehrte Genexpression. Im Gegensatz dazu stand der Methylierungsstatus von H3K4 in SMC in signifikantem Zusammenhang mit der Progression der atherosklerotischen Läsionen (siehe *Figure 2* (Publikation II)). Im fortgeschrittenen Stadium war die Histonmethylierung von H3K4 signifikant erhöht, was ebenfalls mit Erhöhung der Genexpression einhergeht.

Von acht mittels qRT-PCR untersuchten korrespondierenden HMTs konnten nur zwei (MLL2/4 und G9a) detektiert werden. Die Expression von MLL2/4 war in fortgeschrittenen Stadien signifikant erhöht (siehe *Figure 5* (Publikation II)). Um die Expression der korrespondierenden Enzyme noch spezifischer für die individuellen Zelltypen zu untersuchen, wurde eine Mikrodisektion der Präparate durchgeführt und die mRNA Expression in SMCs, Lymphozyten und Makrophagen analysiert (siehe *Figure 6 A- E* (Publikation II)).

Die mittels spezifischer quantitativer PCR ermittelte DNA-Methylierung nahm sowohl bei der repetitiven DNA-Sequenz LINE1 als auch bei Sat- α mit Progression der Atherosklerose kontinuierlich ab (siehe *Figure 7 A*, (Publikation II)). Bei den für die DNA-Methylierung zuständigen Enzymen konnte für DNMT1 eine verringerte Expression in Atherosklerose gezeigt werden (siehe *Figure 7 C-E*, (Publikation II)). DNMT3B zeigte ebenfalls einen Abfall der Expression, wobei die Ergebnisse jedoch keine Signifikanz erreichten. DNMT3A war nicht detektierbar. Für die Demethylase TET1 konnte hingegen ein signifikanter Anstieg der Expression, v.a. in SMCs in fortgeschrittenen Stadien der Atherosklerose festgestellt werden. Zusätzlich wurde die zellfreie DNA, sowie DNA in Monozyten und Lymphozyten im Blut von Patienten mit

hochgradiger Carotisstenose untersucht. Hier zeigte sich für beide repetitive Sequenzen LINE1 und Sat- α eine signifikante Reduktion der Methylierung im Serum von Patienten mit Carotisstenose im Vergleich zu gesunden Probanden (siehe *Figure 7 B*, (Publikation II)). Interessanterweise fand sich bei der DNA der Zellen kein Unterschied hinsichtlich der DNA-Methylierung (siehe *Figure 7 und 8* (Publikation II)).

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse also auf eine herabgesetzte DNA-Methylierung in höheren Stadien der Atherosklerose hin.

Für die vollständige und detaillierte Darstellung wird auf Publikation II im Appendix verwiesen.

4. DISKUSSION

4.1. Diskussion der verwendeten Methoden

4.1.1. IHC und semi-quantitative Auswertung der konsekutiven Färbungen

Trotz sorgfältiger Auswahl und Durchführung der Methoden, ergeben sich gewisse Grenzen dieser Arbeit. Zum einen wurden einzelne repräsentative häufig in der Literatur beschriebene Histonmethylierungs- und acetylierungsstellen ausgewählt von denen bekannt ist, dass sie eindeutig zu epigenetischer Chromatinmodifizierung führen. Andere Positionen von Lysinen anderer Histone, könnten ebenfalls eine Rolle in der Atheroskleroseentstehung spielen. Durch die Anfertigung konsekutiver Schnitte eines Präparats und die doppelte Auswertung durch zwei unabhängige Untersucher kann das Ergebnis zwar objektiviert werden, bleibt jedoch semi-quantitativ. Eine weitere Schwierigkeit stellte die Auswahl gesunder Kontrollarterien dar. Die Kontrollarterien aus unfallchirurgischen Eingriffen bestehen meist aus allen Gefäßwandschichten. Die aus TEA Operationen stammenden atherosklerotischen Carotiden beinhalten zum größten Teil die erkrankte Intima. Auch die zellulären Komponenten sind in gesunden Gefäßen anders verteilt als in Atherosklerose. Daher wurde für Lymphozyten und Makrophagen kein Vergleich der Methylierung und Acetylierung zwischen Kontrollen und

Atherosklerosestadien durchgeführt. Diese Zellen fehlen in der Regel im gesunden Gefäß. Außerdem ist die Verfügbarkeit gesunder Carotisarterien begrenzt, so dass z.B. die Anzahl nicht ausreichte um ein Matching der Studiengruppen nach Alter vorzunehmen.

4.1.2. qRT-PCR zur Expressionsanalyse und Western Blot

Bei der Verwendung von FFPE Proben, kann es problematisch sein eine ausreichend große Menge RNA zu extrahieren. Durch die photometrische Messung des RNA-Gehalts und der RNA-Qualität mit NanoDrop 2000 wurde sichergestellt, genug qualitativ hochwertige cDNA für die PCR-Reaktion zu gewinnen. Auf die Visualisierung der amplifizierten Produkte (z.B. durch Gel-Elektrophorese) wurde verzichtet. Um reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen, wurden kommerzielle Primer der Firma Qiagen verwendet und eine modifizierte RT-PCR Reaktion durchgeführt, um die Detektion der Primer-Dimere zu vermeiden.

4.2. Diskussion der Ergebnisse

4.2.1. Verminderte DNA-Methylierung bei Progression der Atherosklerose

Die Rolle der DNA Methylierung und DNMTs wurde bereits in Krebserkrankungen, sowie Körper- und Organentwicklung erforscht (Andreu-Vieyra et al. 2010, Ordovas and Smith 2010). Für die Atherosklerose ist die Datenlage in diesem Zusammenhang noch sehr gering. Wir konnten zeigen, dass die Expression von DNMT1 in fortgeschrittenen Atherosklerosestadien signifikant vermindert ist. Außerdem war die DNA-Methylierung in humanen Carotisarterien in Atherosklerose bis zu 4-fach reduziert. Diese Ergebnisse stimmen mit der Studie von Hiltunen et al. überein. Dort wurde in ähnlichem Ausmaß DNA-Hypomethylierung in SMCs in atherosklerotischen Kaninchengefäßen festgestellt (Hiltunen, Turunen et al. 2002). DNMT3A konnte in unserer Studie nicht detektiert werden. Die Expression von DNMT3B war sehr niedrig, dennoch in fortgeschrittenen Stadien der Atherosklerose vermindert. Dazu passend,

beobachteten Spin et al. eine signifikante Down-Regulierung von DNMT3A und 3B während der Entdifferenzierung von SMCs (Spin et al. 2010).

Globale DNA Hypermethylierung in peripheren Blutzellen von Patienten mit kardiovaskulärer Erkrankung und chronischer Niereninsuffizienz wurde bereits durch Stenvinkel et al. beschrieben (Stenvinkel et al. 2007). Unsere Daten zeigen interessanterweise keine solchen Veränderungen in den Blutzellen. Die freie DNA im Serum von Patienten mit hochgradiger Carotisstenose war außerdem hypomethyliert. Diese Diskrepanz gilt es zukünftig näher zu untersuchen. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die DNA im Serum direkt aus den apoptotischen und nekrotischen Zellen der Plaques freigesetzt wird (Martinet et al. 2011, Yu et al. 2014). Somit könnte der Methylierungsstatus der zellfreien DNA mit der DNA-Methylierung von Zellen in atherosklerotischen Läsionen korrelieren.

4.2.2. Unterschiede in der Histonmethylierung in frühen und fortgeschrittenen atherosklerotischen Carotisläsionen

Frühere Studien zeigen, dass posttranslationale Veränderungen an Histonen in der Atherosklerose eine Rolle spielen. Die Methylierung von Histonen kann entweder zur Genaktivierung oder zur Reduktion der Genaktivität führen. Di- und Tri-Methylierung von Histon H3K4 führen zu einer verstärkten Genexpression, während di- und tri-Methylierung von H3K9 und H3K27 in einer verminderten Genexpression resultieren (Greer and Shi 2012). In den Publikationen wurde selektiv die di-Methylierung untersucht, weil sie als am weitesten verbreitete Modifikation beschrieben wurde (Bessler et al. 2010). Des Weiteren stellt sie einen notwendigen und effizienten Mechanismus für das Chromatin Remodeling dar. Während die Modifikationen der di-Methylierung breit über die aktiven Genregionen verteilt sind, ist die tri-Methylierung meist auf das 5' Ende dieser Gene lokalisiert und spezifischer (Martin and Zhang 2005). Um einen vollständigen Einblick in die epigenetischen Mechanismen in der Atherosklerose zu bekommen, sollte jedoch in zukünftigen Studien die tri-Methylierung ebenfalls berücksichtigt werden.

Signifikante Veränderungen der Methylierung in atherosklerotischen Carotiden wurden in dieser Studie vor allem für H3K4 und H3K9 nachgewiesen. Die Methylierung von H3K4 war erhöht, während die von H3K9 erniedrigt war. Der stärkste Unterschied fand sich in den SMCs, für H3K9 zusätzlich auch in Leukozyten. Beide Veränderungen (Methylierung von H3K4 und H3K9) führen zu erhöhter Genaktivität. Glatte Muskelzellen sind wichtige Komponenten der Gefäßwand und gewährleisten deren Funktion und Stabilität (Lacolley et al. 2012). Als Reaktion auf verschiedene Stimuli, wie mechanische Endothelläsion oder Lipidakkumulation, ändern sie ihren Phänotyp von kontraktile zu synthetisierend. Dies führt zu einer verstärkten Produktion und Sekretion von Kollagen und Proteoglykanen. So können SMCs in der fibrösen Kappe eines fortgeschrittenen Atheroskleroseplaques entweder eine kritische oder eine begünstigende Rolle für die Stabilität der Läsion spielen, je nach deren Phänotyp. Zusätzlich gehen SMCs oft in Apoptose und/oder aktivieren die Expression verschiedener Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und/oder Entzündungsmediatoren. Diese wiederum führen zur Plaqueruptur und Thrombose (Galis and Khatri 2002, Alexander and Owens 2012). Manabe et al. zeigten, dass Veränderungen in Histonacetylierung und Histonmethylierung (besonders an H3K4) eine Schlüsselrolle in der Kontrolle der Genexpression von SMCs spielen (Manabe and Owens 2001, Martin and Zhang 2005). Ergänzend dazu lässt sich aus den Daten unserer Studie schließen, dass Hypermethylierung von H3K4 und Hypomethylierung von H3K9 die Aktivierung der SMCs in atherosklerotischen Läsionen maßgeblich beeinflussen. Zusätzlich wurde eine signifikante Reduktion der Methylierung von H3K27 beobachtet. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Daten von De Santa et al. (De Santa et al. 2007). Dort wurde festgestellt, dass „gene silencing“ in Makrophagen von der Methylierung an H3K27 abhängt. Unsere Daten implizieren eine potentielle Rolle von H3K27 in Atherosklerose, nicht nur in Makrophagen, sondern auch in inflammatorischen Leukozyten.

Die Histonmethylierung wird von HMTs reguliert, die hoch spezifisch für die jeweilige Lysinposition am N-terminalen Ende der Histone sind. Hier wurde die Expression der wichtigsten für H3K4, H3K9 und H3K27 spezifischen HMTs untersucht. Interessanterweise konnten lediglich 2 der 9 untersuchten Transferasen detektiert werden. Für H3K4 konnte nur die Expression von MLL2 nachgewiesen werden. Die Aktivität war in fortgeschrittenen Atherosklerosestadien im Vergleich zu den Anfangsstadien

signifikant erhöht. MLL2 könnte daher eine potentiell wichtige Methyltransferase darstellen, welche die Methylierung von H3K4 in der Plaque Progression aufrechterhält bzw. erhöht. Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollgefäßen und atherosklerotischen Geweben gezeigt werden. Eine mögliche Erklärung für diese beobachtete Diskrepanz könnte in den unterschiedlichen Phänotypen der SMCs liegen. Diese weisen in gesunden Gefäßen ein anderes Verteilungsmuster auf. In gesunden Arterien haben SMCs hauptsächlich den kontraktiven Phänotyp. In atherosklerotischen Gefäßen zeigen sie vermehrt einen synthetisierenden Phänotyp. Bedenkt man die signifikanten Veränderungen in der Histonmethylierung in SMCs in fortgeschrittener Atherosklerose, ist dies ein Punkt den man bei der Interpretation der Expression von HMTs in Kontrollen berücksichtigen muss. Des Weiteren muss die exakte Rolle von H3K4 Methylierung in SMCs in Atherosklerose in zukünftigen Studien genauer eruiert werden. Bezüglich der Methylierung von H3K9 konnte nur die Transferase G9a detektiert werden. Die Expression war in Kontrollen höher als im Anfangsstadium und in den fortgeschrittenen Stadien der Atherosklerose jedoch wiederum erhöht. Da eine vermehrte Aktivität mit einer erhöhten Methylierung von H3K9 und somit einer verstärkten Inhibition der Genexpression einhergeht, erscheinen diese Ergebnisse zunächst widersprüchlich. Zu erwarten wäre eine Genaktivierung in fortgeschrittenen Stadien, somit eine Abnahme der Expression von G9a. Dies konnte in der Untersuchung der einzelnen Zelltypen für die Makrophagen signifikant gezeigt werden. Somit ließe sich vermuten, dass G9a insbesondere die Funktion der Makrophagen in der Entstehung der Atherosklerose kontrolliert. Zu Bedenken gilt natürlich, dass die Expression einer einzelnen HMT nicht zwangsläufig mit der Histonmethylierung korrelieren muss, da es weitere HMTs gibt, die in dieser Studie nicht untersucht wurden.

4.2.3. Vermehrte Histonacetylierung in fortgeschrittenen Stadien der Atherosklerose

Acetylierung der Histone führt generell zu einer vermehrten Genaktivierung. Eine signifikant erhöhte Acetylierung konnte in dieser Studie für H3K9 und H3K27 in fortgeschrittenen Atherosklerosestadien in SMCs und Makrophagen gezeigt werden.

Diese Ergebnisse sind mit den allgemeinen Kenntnissen über die Pathogenese der Atherosklerose konkordant. Ebenfalls stimmen sie mit den Resultaten von Findeisen et al. überein. Dort wurde gezeigt, dass die Proliferation von SMCs *in vitro* mittels HDAC Inhibitoren verringert werden kann (Findeisen, Gizard et al. 2011). Fish et al. beschreiben, dass sich Hyperacetylierung von H3K9 auf die Expression von eNOS auswirkt, welche eine kritische Rolle in der Aufrechterhaltung der Endothelfunktion spielt (Fish et al. 2005). In diesen Zusammenhang passen unsere Ergebnisse, die zeigten, dass die Acetylierung von H3K9 in Endothelzellen im Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant erhöht war. Interessanterweise scheint in Endothelzellen auch H3K27 eine Rolle zu spielen. Hier fand sich ebenfalls vermehrte Acetylierung, verglichen mit gesunden Gefäßen.

Von den untersuchten HAT zeigte vor allem GCN5L eine erhöhte Expression in fortgeschrittenen Stadien der Atherosklerose. GCN5L gehört zur GNAT Familie der Acetyltransferasen. Sie stellt einen wichtigen Co-Aktivatoren von verschiedenen Transkriptionsfaktoren dar und acetyliert Lysine vornehmlich an Histon H3 (Vetting et al. 2005). Eine weitere HAT, die erhöhte Expression in atherosklerotischen Läsionen zeigte, war MYST1 ein Mitglied der MYST Familie. MYST Proteine sind die größte und gleichzeitig am wenigsten gut verstandene Gruppe der HAT. Die Regulation von Prozessen wie Apoptose, Zellzyklus und Entwicklung wird ihnen zugeschrieben (Thomas and Voss 2007). MYST1 wurde auch im Zusammenhang mit DNA-Transkription und Reparatur beschrieben (Taipale et al. 2005). MYST2 hingegen, welche eine breitere Substratspezifität aufweist, konnte in dieser Studie nicht detektiert werden. Eine Expression von p300, ein Vertreter der p300/CREB-binding protein-associated factor group (PCAF), konnte in den atherosklerotischen Carotisläsionen nachgewiesen werden, zeigte jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Studiengruppen. Dieses Protein ist Teil von Transkriptionsregulationskomplexen mit multipler HAT-Aktivität. Seine Substratspezifität ist sehr breit und schließt die Histone H3, H4, H2A und H2B ein, sowie nicht-Histon Proteine (Sternier and Berger 2000). Die sehr breite Spezifität sowie die Tatsache, dass p300 ein Bestandteil von verschiedenen Transkriptionskomplexen sein kann, ist eine mögliche Erklärung warum keine Unterschiede in der Expression zwischen gesunden Gefäßen und atherosklerotischen Carotiden gefunden werden konnten. Generell ist zu beachten, dass die Expression in den

atherosklerotischen Plaques, die in der vorliegenden Studie analysiert wurden sehr gering war. Sie erreichte nur 1/30 bis 1/100 des Expressionslevels von GAPDH, in einigen Fällen lag sie sogar noch niedriger. Neben den sehr geringen Expressionsleveln wiesen die Studiengruppen in sich eine hohe Heterogenität auf. Dies sollte bei der Interpretation, inwiefern die HAT-Aktivität tatsächlich mit dem Acetylierungsstatus der Histone korreliert, beachtet werden.

Zusammenfassend betrachtet zeigten die Ergebnisse der beiden Publikationen, dass mit der Progression der Atherosklerose signifikante Unterschiede in den untersuchten epigenetischen Modifikationen einhergehen. Diese Veränderungen wurden einerseits auf DNA-Ebene festgestellt. Dort wurde eine signifikante Hypomethylierung der repetitiven Sequenzen LINE1 und SAT α in atherosklerotischen Läsionen beobachtet. Andererseits waren Histonmethylierung und -acetylierung in Korrelation zu den Atherosklerosestadien signifikant verändert. Die Umstellung der Epigenetik betraf insbesondere glatte Muskelzellen und inflammatorische Zellen. In den meisten Fällen führten die epigenetischen Veränderungen in den atherosklerotischen Plaques der Carotisgefäße zur erhöhten Genaktivität. Da die Atherosklerose immer noch die führende Ursache von häufigen kardiovaskulären Erkrankungen, lohnt es sich zweifellos epigenetische Prozesse in atherosklerotischen Läsionen auch zukünftig weiter aufzuschlüsseln, um beispielsweise Biomarker für vulnerable Plaques zu finden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

5.1. Publikation I

Zum Zeitpunkt der Studienplanung war wenig über die Epigenetik und deren Rolle in der Atherosklerose bekannt. Daher wurden zuerst die wichtigen epigenetischen Modifikationen, wie Histonacetylierung und Histonmethylierung, sowie die Expression einiger ausgewählten dazugehörigen Transferasen in verschiedenen Stadien atherosklerotischer Carotisplaques und gesunden Kontrollgefäßen untersucht.

Hierfür wurden Proben von humanen atherosklerotischen Carotisarterien aus der Biobank der Klinik und Poliklinik für Vaskuläre und Endovaskuläre Chirurgie (n=80), die verschiedene Ausprägungsgrade der Atherosklerose beinhalten, untersucht. Das atherosklerotische Gewebe wurde gemäß der von AHA (American Heart Association) anerkannten Stadien der Atherosklerose entsprechend klassifiziert und in die Studiengruppen Frühstadium (Typ I-III) und Spätstadium (Typ V-VII) eingeteilt. Zehn gesunde Gefäße aus der Unfallchirurgie dienten als Kontrolle. Die Expression der HATs (GNAT-Gruppe: GCN5L, P300/CBP-Gruppe: P300, MYST-Gruppe: MYST1, MYST2), sowie der HMTs (H3K4: MLL2/4, SET7/9, hSET1A; H3K9: SUV39H1, SUV39H2, ESET/SETDB1, EHMT1; H3K27: EZH2, G9a) erfolgte mittels SYBR-Green basierter qRT-PCR. Histonacetylierung und -methylierung in den Zellen innerhalb der Carotisplaques wurde mittels Immunhistochemie (IHC) bestimmt.

Histonacetylierung war bei H3K9 und H3K27 in SMCs in fortgeschrittenen Stadien, verglichen mit gesunden Kontrollen, signifikant erhöht (p=0.002 und 0.034). Die Acetylierung von H3K9 in SMCs und Makrophagen korrelierte mit der Progression der Atherosklerose (p=0.048 und <0.001). Die Expression von GCN5L und MYST1 waren mit dem Schweregrad der Atherosklerose signifikant assoziiert (p=0.001). Histonmethylierung von H3K9 und H3K37 war in SMCs und inflammatorischen Zellen in fortgeschrittenen Stadien signifikant reduziert (p<0.001 und p=0.026), während H3K4 mit Progression der Atherosklerose vermehrt methyliert war. Die Expression von MLL2/4 war in fortgeschrittenen Stadien signifikant erhöht (p<0.001).

Ich trug maßgeblich zu der Entstehung der Publikation bei, konzipierte und schrieb die erste Version des Manuskripts. Weiterhin akquirierte ich die meisten Daten. Konkret habe ich die geeigneten Präparate für die Studie ausgewählt und histologisch charakterisiert, ebenso die immunhistochemische Färbung durchgeführt und ausgewertet. Weiterhin habe ich die Expression der HMTs und HATs mittels qRT-PCR untersucht. Die erhobenen Daten wurden anschließend zusammen mit dem Betreuer, PD Dr. Pelisek, analysiert und interpretiert. Dr. Pelisek und mein Doktorvater Prof. Eckstein haben anschließend das Manuskript überarbeitet und die endständige Fassung erstellt.

5.2. Publikation II

In dieser Arbeit wurde auf Histon- und DNA-Methylierung, sowie die Expression der korrespondierenden Transferasen in frühen und fortgeschrittenen atherosklerotischen Carotisläsionen detaillierter eingegangen und mit gesunden Gefäßen verglichen.

Als Methoden wurden Western Blot, Immunhistochemie (IHC), PCR und RT-PCR eingesetzt. Mittels Western Blot wurde die di-Methylierung von H3K4, H3K9 und H3K27 in frühen (n=60) und fortgeschrittenen (n=60) Carotisplaques untersucht. Als Vergleich dienten 12 gesunde Carotisarterien. Hier war die Methylierung von H3K4 unverändert, während die von H3K9 und H3K27 signifikant reduziert erschien. Die IHC zeigte eine vermehrte di-Methylierung von H3K4 in SMCs. Di-methyliertes H3K9 war in SMCs und inflammatorischen Zellen vermindert und H3K27 in inflammatorischen Zellen in fortgeschrittener Atherosklerose signifikant weniger methyliert als in frühen Stadien. Die Expression von MLL2/4 und G9a lag in den fortgeschrittenen Stadien signifikant höher. Mittels PCR, wurde signifikante DNA-Hypomethylierung in frühen und fortgeschrittenen Plaques, sowie im zellfreien Serum von Patienten mit hochgradiger Carotisstenose gegenüber den Kontrollen beobachtet. Die Expression von DNMT1 war in atherosklerotischen Plaques signifikant reduziert, die Expression der Demethylase TET1 dagegen in atherosklerotischen Läsionen erhöht.

Konkordant mit den Ergebnissen der ersten Publikation, waren die Histon-Methylierung in Atherosklerose signifikant verändert. Weiterhin ging die DNA-Hypomethylierung signifikant mit dem Schweregrad der Atherosklerose einher. Dies

deutet auf eine mögliche Beeinflussung des Pathomechanismus der Atherosklerose durch epigenetische Prozesse hin.

Auch bei dieser Publikation trug ich maßgeblich zu deren Entstehung bei und beteiligte mich, zusammen mit der Co-Autorin Dr. Culmes, am Schreiben des Manuskripts und Akquirierung der meisten Daten. Der Eigenanteil lag beim Aussuchen geeigneter Präparate, sowie Klassifizierung in die Studiengruppen, Durchführung der immunhistochemischen Färbungen und deren Analyse. Weiterhin wurde die Untersuchung der Expression der HMTs mittels qRT-PCR durchgeführt, sowie die Mikro-Dissektion der Präparate und anschließende Expressionsanalyse mittels PCR. Die Studiendaten wurden anschließend mit Hilfe des Betreuers ausgewertet. Die Co-Autorin Mihaela Culmes führte die Untersuchung der DNA-Methylierung in den FFPE-, sowie in den Blutproben durch.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Alexander, M. R. and G. K. Owens (2012). "Epigenetic control of smooth muscle cell differentiation and phenotypic switching in vascular development and disease." Annu Rev Physiol **74**: 13-40.

Andreu-Vieyra, C. V., R. Chen, J. E. Agno, S. Glaser, K. Anastassiadis, A. F. Stewart and M. M. Matzuk (2010). "MLL2 is required in oocytes for bulk histone 3 lysine 4 trimethylation and transcriptional silencing." PLoS Biol **8**(8).

Assmann, G., P. Cullen and H. Schulte (1998). "The Munster Heart Study (PROCAM). Results of follow-up at 8 years." Eur Heart J **19 Suppl A**: A2-11.

Baccarelli, A. and S. Ghosh (2012). "Environmental exposures, epigenetics and cardiovascular disease." Curr Opin Clin Nutr Metab Care **15**(4): 323-329.

Bannister, A. J. and T. Kouzarides (2011). "Regulation of chromatin by histone modifications." Cell Res **21**(3): 381-395.

Bessler, J. B., E. C. Andersen and A. M. Villeneuve (2010). "Differential localization and independent acquisition of the H3K9me2 and H3K9me3 chromatin modifications in the *Caenorhabditis elegans* adult germ line." PLoS Genet **6**(1): e1000830.

Castillo-Diaz, S. A., M. E. Garay-Sevilla, M. A. Hernandez-Gonzalez, M. O. Solis-Martinez and S. Zaina (2010). "Extensive demethylation of normally hypermethylated CpG islands occurs in human atherosclerotic arteries." Int J Mol Med **26**(5): 691-700.

Cedar, H. and Y. Bergman (2009). "Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms." Nat Rev Genet **10**(5): 295-304.

Chi, P., C. D. Allis and G. G. Wang (2010). "Covalent histone modifications--miswritten, misinterpreted and mis-erased in human cancers." Nat Rev Cancer **10**(7): 457-469.

Choi, S. H., K. Heo, H. M. Byun, W. An, W. Lu and A. S. Yang (2011). "Identification of preferential target sites for human DNA methyltransferases." Nucleic Acids Res **39**(1): 104-118.

Cybulsky, M. I. and M. A. Gimbrone, Jr. (1991). "Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis." Science **251**(4995): 788-791.

De Santa, F., M. G. Totaro, E. Prosperini, S. Notarbartolo, G. Testa and G. Natoli (2007). "The histone H3 lysine-27 demethylase Jmjd3 links inflammation to inhibition of polycomb-mediated gene silencing." Cell **130**(6): 1083-1094.

Dong, C., W. Yoon and P. J. Goldschmidt-Clermont (2002). "DNA methylation and atherosclerosis." J Nutr **132**(8 Suppl): 2406S-2409S.

Findeisen, H. M., F. Gizard, Y. Zhao, H. Qing, E. B. Heywood, K. L. Jones, D. Cohn and D. Brummer (2011). "Epigenetic regulation of vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation by histone deacetylase inhibition." Arterioscler Thromb Vasc Biol **31**(4): 851-860.

- Fischle, W., Y. Wang and C. D. Allis (2003). "Histone and chromatin cross-talk." Curr Opin Cell Biol **15**(2): 172-183.
- Fish, J. E., C. C. Matouk, A. Rachlis, S. Lin, S. C. Tai, C. D'Abreo and P. A. Marsden (2005). "The expression of endothelial nitric-oxide synthase is controlled by a cell-specific histone code." J Biol Chem **280**(26): 24824-24838.
- Gahremanpour, A., E. C. Perin and G. Silva (2012). "Carotid artery stenting versus endarterectomy: a systematic review." Tex Heart Inst J **39**(4): 474-487.
- Galis, Z. S. and J. J. Khatri (2002). "Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly." Circ Res **90**(3): 251-262.
- Grau, A. J., C. Weimar, F. Buggle, A. Heinrich, M. Goertler, S. Neumaier, J. Glahn, T. Brandt, W. Hacke and H. C. Diener (2001). "Risk factors, outcome, and treatment in subtypes of ischemic stroke: the German stroke data bank." Stroke **32**(11): 2559-2566.
- Greer, E. L. and Y. Shi (2012). "Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance." Nat Rev Genet **13**(5): 343-357.
- Greissel, A., M. Culmes, R. Napieralski, E. Wagner, H. Gebhard, M. Schmitt, A. Zimmermann, H. H. Eckstein, A. Zerneck and J. Pelisek (2015). "Alternation of histone and DNA methylation in human atherosclerotic carotid plaques." Thromb Haemost **114**(2).
- Hahn, C. and M. A. Schwartz (2009). "Mechanotransduction in vascular physiology and atherogenesis." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(1): 53-62.
- Hansson, G. K. (2005). "Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease." N Engl J Med **352**(16): 1685-1695.
- Hernando-Herraez, I., R. Garcia-Perez, A. J. Sharp and T. Marques-Bonet (2015). "DNA Methylation: Insights into Human Evolution." PLoS Genet **11**(12): e1005661.
- Hildmann, C., D. Riester and A. Schwienhorst (2007). "Histone deacetylases--an important class of cellular regulators with a variety of functions." Appl Microbiol Biotechnol **75**(3): 487-497.
- Hiltunen, M. O., M. P. Turunen, T. P. Hakkinen, J. Rutanen, M. Hedman, K. Makinen, A. M. Turunen, K. Aalto-Setälä and S. Ylä-Herttuala (2002). "DNA hypomethylation and methyltransferase expression in atherosclerotic lesions." Vasc Med **7**(1): 5-11.
- Homocysteine Studies, C. (2002). "Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: a meta-analysis." JAMA **288**(16): 2015-2022.
- Huidobro, C., A. F. Fernandez and M. F. Fraga (2013). "The role of genetics in the establishment and maintenance of the epigenome." Cell Mol Life Sci **70**(9): 1543-1573.
- Ingrosso, D. and A. F. Perna (2009). "Epigenetics in hyperhomocysteinemic states. A special focus on uremia." Biochim Biophys Acta **1790**(9): 892-899.
- Jablonka, E. and M. J. Lamb (2002). "The changing concept of epigenetics." Ann N Y Acad Sci **981**: 82-96.

- Klose, R. J. and Y. Zhang (2007). "Regulation of histone methylation by demethylination and demethylation." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(4): 307-318.
- Koole, D., J. Heyligers, F. L. Moll and G. Pasterkamp (2012). "Intraplaque neovascularization and hemorrhage: markers for cardiovascular risk stratification and therapeutic monitoring." J Cardiovasc Med (Hagerstown) **13**(10): 635-639.
- Lacolley, P., V. Regnault, A. Nicoletti, Z. Li and J. B. Michel (2012). "The vascular smooth muscle cell in arterial pathology: a cell that can take on multiple roles." Cardiovasc Res **95**(2): 194-204.
- Lim, S. and S. Park (2014). "Role of vascular smooth muscle cell in the inflammation of atherosclerosis." BMB Rep **47**(1): 1-7.
- Manabe, I. and G. K. Owens (2001). "Recruitment of serum response factor and hyperacetylation of histones at smooth muscle-specific regulatory regions during differentiation of a novel P19-derived in vitro smooth muscle differentiation system." Circ Res **88**(11): 1127-1134.
- Martin, C. and Y. Zhang (2005). "The diverse functions of histone lysine methylation." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(11): 838-849.
- Martinet, W., D. M. Schrijvers and G. R. De Meyer (2011). "Necrotic cell death in atherosclerosis." Basic Res Cardiol **106**(5): 749-760.
- Mattagajasingh, I., C. S. Kim, A. Naqvi, T. Yamamori, T. A. Hoffman, S. B. Jung, J. DeRicco, K. Kasuno and K. Irani (2007). "SIRT1 promotes endothelium-dependent vascular relaxation by activating endothelial nitric oxide synthase." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(37): 14855-14860.
- Natarajan, R. (2011). "Drugs targeting epigenetic histone acetylation in vascular smooth muscle cells for restenosis and atherosclerosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **31**(4): 725-727.
- Ordovas, J. M. and C. E. Smith (2010). "Epigenetics and cardiovascular disease." Nat Rev Cardiol **7**(9): 510-519.
- Razin, A. and A. D. Riggs (1980). "DNA methylation and gene function." Science **210**(4470): 604-610.
- Rea, S., F. Eisenhaber, D. O'Carroll, B. D. Strahl, Z. W. Sun, M. Schmid, S. Opravil, K. Mechtler, C. P. Ponting, C. D. Allis and T. Jenuwein (2000). "Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases." Nature **406**(6796): 593-599.
- Rodriguez-Saldana, J., M. Rodriguez-Flores, C. Cantu-Brito and J. Aguirre-Garcia (2014). "A pathological study of the epidemiology of atherosclerosis in Mexico city." Cardiol Res Pract **2014**: 264205.
- Ross, R. (1993). "The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s." Nature **362**(6423): 801-809.
- Roth, S. Y., J. M. Denu and C. D. Allis (2001). "Histone acetyltransferases." Annu Rev Biochem **70**: 81-120.
- Santos-Rosa, H. and C. Caldas (2005). "Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer." Eur J Cancer **41**(16): 2381-2402.

Schleithoff, C., S. Voelter-Mahlknecht, I. N. Dahmke and U. Mahlknecht (2012). "On the epigenetics of vascular regulation and disease." Clin Epigenetics **4**(1): 7.

Shahbazian, M. D. and M. Grunstein (2007). "Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation." Annu Rev Biochem **76**: 75-100.

Shi, G. M., T. Jiang, H. Zhang, M. H. Li, M. Wang, Y. K. Liu, H. C. Shi, F. Zhou, Q. Huang, L. Y. Zhang, J. S. Zhou and Y. D. Zhang (2015). "Carotid endarterectomy and carotid artery stenting lead to improved cognitive performance in patients with severe carotid artery stenosis." Curr Neurovasc Res.

Shi, Y., F. Lan, C. Matson, P. Mulligan, J. R. Whetstone, P. A. Cole, R. A. Casero and Y. Shi (2004). "Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1." Cell **119**(7): 941-953.

Skalen, K., M. Gustafsson, E. K. Rydberg, L. M. Hulten, O. Wiklund, T. L. Innerarity and J. Boren (2002). "Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis." Nature **417**(6890): 750-754.

Solberg, L. A. and J. P. Strong (1983). "Risk factors and atherosclerotic lesions. A review of autopsy studies." Arteriosclerosis **3**(3): 187-198.

Spin, J. M., T. Quertermous and P. S. Tsao (2010). "Chromatin remodeling pathways in smooth muscle cell differentiation, and evidence for an integral role for p300." PLoS One **5**(12): e14301.

Strydom, H. C. (1992). "Composition and classification of human atherosclerotic lesions." Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol **421**(4): 277-290.

Strydom, H. C. (2000). "Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update." Arterioscler Thromb Vasc Biol **20**(5): 1177-1178.

Strydom, H. C., A. B. Chandler, R. E. Dinsmore, V. Fuster, S. Glagov, W. Insull, Jr., M. E. Rosenfeld, C. J. Schwartz, W. D. Wagner and R. W. Wissler (1995). "A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association." Circulation **92**(5): 1355-1374.

Strydom, H. C., A. B. Chandler, S. Glagov, J. R. Guyton, W. Insull, Jr., M. E. Rosenfeld, S. A. Schaffer, C. J. Schwartz, W. D. Wagner and R. W. Wissler (1994). "A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association." Arterioscler Thromb **14**(5): 840-856.

Stenvinkel, P., M. Karimi, S. Johansson, J. Axelsson, M. Suliman, B. Lindholm, O. Heimbürger, P. Barany, A. Alvestrand, L. Nordfors, A. R. Qureshi, T. J. Ekstrom and M. Schalling (2007). "Impact of inflammation on epigenetic DNA methylation - a novel risk factor for cardiovascular disease?" J Intern Med **261**(5): 488-499.

Sternberg, D. E. and S. L. Berger (2000). "Acetylation of histones and transcription-related factors." Microbiol Mol Biol Rev **64**(2): 435-459.

Strong, J. P., G. T. Malcom and M. C. Oalman (1995). "Environmental and genetic risk factors in early human atherogenesis: lessons from the PDAY study. Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth." Pathol Int **45**(6): 403-408.

Szyf, M. (2009). "Epigenetics, DNA methylation, and chromatin modifying drugs." Annu Rev Pharmacol Toxicol **49**: 243-263.

Taipale, M., S. Rea, K. Richter, A. Vilar, P. Lichter, A. Imhof and A. Akhtar (2005). "hMOF histone acetyltransferase is required for histone H4 lysine 16 acetylation in mammalian cells." Mol Cell Biol **25**(15): 6798-6810.

Thomas, T. and A. K. Voss (2007). "The diverse biological roles of MYST histone acetyltransferase family proteins." Cell Cycle **6**(6): 696-704.

Tiemeier, H., W. van Dijck, A. Hofman, J. C. Witteman, T. Stijnen and M. M. Breteler (2004). "Relationship between atherosclerosis and late-life depression: the Rotterdam Study." Arch Gen Psychiatry **61**(4): 369-376.

Turunen, M. P. and S. Yla-Herttuala (2011). "Epigenetic regulation of key vascular genes and growth factors." Cardiovasc Res **90**(3): 441-446.

Vetting, M. W., S. d. C. LP, M. Yu, S. S. Hegde, S. Magnet, S. L. Roderick and J. S. Blanchard (2005). "Structure and functions of the GNAT superfamily of acetyltransferases." Arch Biochem Biophys **433**(1): 212-226.

Waddington, C. H. (2012). "The epigenotype. 1942." Int J Epidemiol **41**(1): 10-13.

Wattanakit, K., J. E. Williams, P. J. Schreiner, A. T. Hirsch and A. R. Folsom (2005). "Association of anger proneness, depression and low social support with peripheral arterial disease: the Atherosclerosis Risk in Communities Study." Vasc Med **10**(3): 199-206.

Weisenberger, D. J., B. N. Trinh, M. Campan, S. Sharma, T. I. Long, S. Ananthnarayan, G. Liang, F. J. Esteva, G. N. Hortobagyi, F. McCormick, P. A. Jones and P. W. Laird (2008). "DNA methylation analysis by digital bisulfite genomic sequencing and digital MethyLight." Nucleic Acids Res **36**(14): 4689-4698.

Wayne, T. F. (2014). "Epigenetics in the development, modification, and prevention of cardiovascular disease." Mol Biol Rep.

WHO (2002). World Health Report 2002: Reducing Risks, Promoting Healthy Life. Geneva, Switzerland, World Health Organization.

WHO. (2012). from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>.

Wu, S. C. and Y. Zhang (2010). "Active DNA demethylation: many roads lead to Rome." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(9): 607-620.

Xiao, B., C. Jing, J. R. Wilson, P. A. Walker, N. Vasisht, G. Kelly, S. Howell, I. A. Taylor, G. M. Blackburn and S. J. Gamblin (2003). "Structure and catalytic mechanism of the human histone methyltransferase SET7/9." Nature **421**(6923): 652-656.

Yan, M. S., C. C. Matouk and P. A. Marsden (2010). "Epigenetics of the vascular endothelium." J Appl Physiol (1985) **109**(3): 916-926.

Yu, J., G. Gu and S. Ju (2014). "Recent advances in clinical applications of circulating cell-free DNA integrity." Lab Med **45**(1): 6-11.

Zhang, Y., J. Qiu, X. Wang, Y. Zhang and M. Xia (2011). "AMP-activated protein kinase suppresses endothelial cell inflammation through phosphorylation of transcriptional coactivator p300." Arterioscler Thromb Vasc Biol **31**(12): 2897-2908.

7. DANKSAGUNG

Den folgenden Abschnitt möchte ich all jenen Personen widmen, ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Mein herzlicher Dank geht an Prof. Dr. Eckstein für die Überlassung dieses spannenden und fordernden Themas, sowie die umfassende Betreuung.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Pelisek für die außerordentlich engagierte Unterstützung bei der Durchführung des Projekts. Bei der Planung, während der Versuchsdurchführung im Labor und bei der Veröffentlichung der Ergebnisse stand er mit seiner Erfahrung jederzeit beratend und kritisch zur Seite. Dabei war er immer geduldig und hatte ein offenes Ohr für alle Fragen.

Weiterer Dank gilt Renate Hegenloh für die hilfreichen Ratschläge im Laboralltag, sowie für bereichernde Gespräche und die tolle Atmosphäre im Labor.

Danke an Mihaela Culmes für das Zustandekommen der gemeinsamen Publikationen.

Ebenso bedanken möchte ich mich beim Forschungslabor der Orthopädie, Klinikum rechts der Isar, für die Ermöglichung der Mitbenutzung des qPCR-Gerätes.

Zuletzt gilt mein tiefster Dank meinen Eltern, die mir das Studium ermöglichten und mich jederzeit dabei unterstützten.

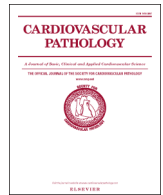
8. APPENDIX

8.1. Publikation I

Greißel A., Culmes M., Burgkart R., Zimmermann A., Eckstein H.-H., Zerneck A., Pelisek J. **Histone acetylation and methylation significantly change with severity of atherosclerosis in human carotid plaques.** *Cardiovascular Pathology* 2016 Mar-Apr; 25(2): 79-86.

8.2. Publikation II

Greißel A., Culmes M., Napieralski R., Wagner E., Gebhard H., Schmitt M., Zimmermann A., Eckstein H. H., Zerneck A., Pelisek, J. **Alternation of histone and DNA methylation in human atherosclerotic carotid plaques.** *Thrombosis and Haemostasis* 2015 Aug; 114(2): 39



Original Article

Histone acetylation and methylation significantly change with severity of atherosclerosis in human carotid plaques



Anna Greißel^a, Mihaela Culmes^a, Rainer Burgkart^b, Alexander Zimmermann^a, Hans-Henning Eckstein^a, Alma Zerneck^{a,c}, Jaroslav Pelisek^{a,*}

^a Department of Vascular and Endovascular Surgery, Klinikum rechts der Isar der Technischen Universitaet Muenchen, Germany

^b Clinic of Orthopedics, Klinikum rechts der Isar der Technischen Universitaet Muenchen, Germany

^c Institute of Clinical Biochemistry and Pathobiochemistry, University Hospital, Wuerzburg, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 February 2015

Received in revised form 30 October 2015

Accepted 2 November 2015

Available online xxxx

Keywords:

Carotid artery

Atherosclerosis

Epigenetics

Histone acetylation and methylation

Methyl- and acetyltransferases

ABSTRACT

Background: The aim of the study was to analyze histone acetylation, methylation, and the expression of their corresponding transferases in atherosclerotic plaques of patients with carotid artery stenosis.

Methods: Atherosclerotic tissue from our biobank ($n=80$) was divided into various segments covering all plaque stages and classified according to the American Heart Association. The plaques were assigned to early (types I–III) or advanced (types V–VII) stage group of atherosclerosis. Ten healthy carotid arteries from transplant donors served as controls. The expression of histone acetyltransferases (GNAT group: *GCN5L*, P300/CBP group: *P300*, MYST group: *MYST1* and *MYST2*) and histone methyltransferases (H3K4: *MLL2/4*, *SET7/9*, and *hSET1A*; H3K9: *SUV39H1*, *SUV39H2*, *ESET/SETDB1*, and *EHMT1*; H3K27: *EZH2* and *G9a*) was analyzed by SYBR-green-based real-time polymerase chain reaction. Histone acetylation/methylation in the cells within atherosclerotic plaques was determined by immunohistochemistry.

Results: Increased histone acetylation was observed on H3K9 and H3K27 in smooth muscle cells (SMCs) in advanced atherosclerotic lesions compared to healthy vessels ($P=.002$ and $.034$). H3K9 acetylation in SMCs and macrophages was associated with plaque severity of atherosclerosis ($P=.048$ and $<.001$). Expression of *GCN5L* and *MYST1* also correlated with the severity of atherosclerosis ($P<.001$). Methylation of H3K9 and H3K27 was significantly reduced in atherosclerotic plaques in SMCs and inflammatory cells ($P<.001$ and $.026$). Methylation on H3K4 was significantly associated with the severity of atherosclerosis. Expression of methyltransferase *MLL2/4* was increased in advanced stages of atherosclerosis ($P<.001$).

Conclusions: Histone acetylation and methylation seem to play a decisive role in atherosclerosis, showing significant differences between healthy vessels and vessels at different stages of atherosclerosis.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Epigenetics describe heritable posttranslational modifications of DNA or histones, while the DNA sequence itself remains unchanged [1]. These processes are influenced by various physiological alterations (e.g., development, aging) and environmental factors (diet, drugs, smoking, etc.). Furthermore, epigenetic state can be altered by various human diseases [2]. In the nucleus, DNA is wrapped around octamers composed of dimeric histones H2A, H2B, H3, and H4, forming chromatin. Different modifications of their N-terminal tails, such as acetylation, methylation, phosphorylation, ubiquitination, and SUMOylation, regulate the accessibility of DNA for transcription factors [3]. Histone

acetylation and methylation are mechanisms of particular importance in the modulation of chromatin structure. Transfer of acetyl groups to amino groups of lysines by histone acetyltransferases (HATs), as well as the effect of steric hindrance, facilitates the binding of transcription factors to DNA and consequently increases gene expression. HAT families consist of the GNAT/MYST and P300/CPB groups, basal transcription factors, and nuclear receptor cofactors [4,5]. Transfer of acetyl groups to histone lysine residues seems to follow a global pattern, but acetylation on specific lysine residues is also possible [4]. Histone deacetylases (HDACs) can remove the acetyl groups and have a reverse effect on transcription [5]. In this context, epigenetic modification is mostly a dynamic process. In contrast to acetylation, methylation of histones is a more complex procedure that does not always lead to gene activation [6]. Whether genes are silenced or activated depends on the histone methylation site and whether monomethylation, dimethylation, or trimethylation takes place [7]. As the epigenome is influenced by many interacting external factors, understanding its modification is thought to be one of the keys to comprehend diseases of multifactorial

No special funding.

* Corresponding author. Department of Vascular and Endovascular Surgery, Klinikum rechts der Isar der Technischen Universitaet Muenchen, Ismaninger Strasse 22, D-81675 Munich, Germany. Tel.: +49-89-4140-5168; fax: +49-89-4140-4861.

E-mail address: jaroslav.pelisek@tum.de (J. Pelisek).

genesis. A lot of work has been done in the field of cancer research in this regard [4,8]. Interestingly, however, almost nothing is known about the influence of epigenetics on cardiovascular diseases. Currently, there is increasing evidence that atherosclerotic processes might also be affected by epigenetic mechanisms. Growth, differentiation, migration, contractility, inflammation, and deposition of extracellular matrix by smooth muscle cells (SMCs) have been shown to be regulated by HAT and HDAC activity [9]. Increased inflammation due to endothelial injury has already been associated with DNA hypermethylation [10], resulting in the recruitment of inflammatory cells, which are known to be regulated by lysine acetylation [11]. The adhesion of monocytes to endothelial cells via VCAM-1 leads to progression of atherosclerosis and is regulated e.g. by the activity of HATs [12]. Another important factor for the function of the vascular endothelium is nitric oxide synthase (eNOS), which is controlled by both histone acetylation and methylation [13].

Given the evidence that epigenetic mechanisms might be closely related to the development and/or progression of atherosclerosis, this study focuses on the two most important histone modifications: acetylation and methylation. Our intention was to determine whether any differences appear concerning these histone modifications in early and advanced atherosclerotic plaques compared with healthy human carotid arteries. In addition, we attempted to assign specific histone alterations to individual cell types within the carotid atherosclerotic plaques by means of immunohistochemistry. Moreover, expression of selected corresponding methyltransferase and acetyltransferases was analyzed in order to reveal epigenetic factors involved in the pathogenesis of atherosclerosis.

2. Materials and methods

2.1. Study population

Carotid tissue samples from 80 patients who underwent carotid endarterectomy were selected from our biobank in the Department of Vascular and Endovascular Surgery (Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität Muenchen, Germany). The patient demographic data are summarized in Table 1. Carotid lesions were dissected into three to five pieces dependent upon the size of the plaque tissue, in order to cover the different plaque stages, characterized according to the American Heart Association (AHA) classification and divided into early (types I–III) or advanced (types V–VII) atherosclerosis stage groups [14–16]. Atherosclerosis-free carotid vessels ($n=10$) of individuals obtained from the Department of Trauma Surgery served as controls (Table 1). The study was performed according to the guidelines of the World Medical Association Declaration of Helsinki. The local ethics committee of our university hospital approved the study and written informed consent was given by all patients.

Table 1
Patient characteristics

	Carotid patients ($n=80$)	Healthy controls ($n=10$)
Age (years)	70.5±8.9	59.8±5.2
Gender (male)	61.3%	60%
Neurological symptom	41.3%	0%
Hypertension	82.5%	N.N.
Hyperlipidemia	48.8%	N.N.
Smoking	36.3%	N.N.
Diabetes mellitus	35.0%	N.N.
Chronic kidney disease	5.0%	N.N.
Coronary disease	23.8%	N.N.
Aspirin/clopidogrel	93.8%	N.N.
Beta-blocker	48.8%	N.N.
ACE inhibitors	35.0%	N.N.
Statins	73.8%	N.N.

N.N. – not known.

2.2. Histology and plaque characterization

Carotid plaques were segmented in blocks of 3–4 mm, fixed in formalin, and embedded in paraffin (FFPE). As described above, segmentation was performed to cover different stages of atherosclerosis between type I and type VII. Hematoxylin–eosin and Elastica van Gieson staining were performed in order to assess the type of atherosclerotic lesions. The evaluation of plaque morphology and assessment of the intensity of staining for each antibody and all tissue samples was performed by two independent investigators blinded for the study outcome. In addition, the results were discussed with an experienced pathologist. Histological classification of carotid atherosclerotic lesions was performed as described by Stary and colleagues and approved by AHA [14–16].

2.3. Immunohistochemistry

All slides were coated with poly-L-lysine solution (0.1% w/v in water; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) in order to improve specimen adhesion during the staining procedure. Immunohistochemistry was performed on all tissue samples in order to differentiate endothelial cells (antihuman-CD31, mouse monoclonal, clone JC70A, dilution 1:100; Dako, Glostrup, Denmark), lymphocytes (antihuman-CD45 common leukocyte antigen, mouse monoclonal, clones 2B11 and PD7126, dilution 1:200; Dako), macrophages/monocytes (anti-CD68, mouse monoclonal, clone KP1, dilution 1:2000; Dako), and SMCs (antismooth muscle actin, mouse monoclonal, clone HHF35, dilution 1:200; Dako). Subsequently, the following antibodies were used in order to detect the specific acetylation sites on histones: antihistone H3 (acetylK27) antibody ([EP8654] (ab45173), rabbit monoclonal, dilution 1:4000; Abcam, Cambridge, UK) and antihistone H3 (acetylK9) antibody ([Y28] (ab32129), rabbit monoclonal, dilution 1:2000, Abcam). For detection of methylation sites, the following antibodies were applied: dimethylhistone H3 (Lys4) [(C64G9), rabbit monoclonal, dilution 1:3000; Cell Signaling Technology Inc., Danvers, USA], dimethylhistone H3 (Lys9) (polyclonal, source: rabbit, dilution 1:200; Cell Signaling Technology Inc.), and dimethylhistone H3 (Lys27) [(D18C8)XP, rabbit monoclonal, dilution 1:1000; Cell Signaling Technology Inc.]. For visualization, the APAAP method was used for antismooth muscle actin and the LSAB method for the rest of the antibodies (REAL Detection System APAAP Mouse and Peroxidase/DAB + Rabbit/Mouse; Dako).

2.4. Semiquantitative analysis of histone acetylation and methylation in the individual cells within carotid atherosclerotic plaques

In all cases, immunohistochemical analyses of histone acetylation and methylation were performed on slides consecutive to the stained SMCs (SM-actin), lymphocytes (CD45), endothelial cells (neovascularisation) (CD31), and macrophages/macrophage-derived foam cells (CD68) (as an example of consecutive staining, see supplementary Fig. 1). In order to evaluate the expression level in a semiquantitative manner, the staining intensity was analyzed in the individual cells over the entire carotid plaque located on the slide by two independent investigators. First, the maximal staining intensity was assessed for each individual cell type and the corresponding histone acetylation (H3K9 and H3K27) and methylation (H3K4, H3K9, and H3K27). Then, semiquantitative scoring between 0 (no staining) and 1 (maximal observed positive staining for the individual antibody used) was estimated. The graduation was performed in five steps assigning maximal staining intensity 100% (or 1.0) as +++++, 80% (0.8) as ++++, 60% (0.6) as +++, 40% (0.4) as ++, 20% (0.2) as +, and 0% (0) – as a negative staining. These analyses were performed for all slides and median and range were calculated accordingly.

2.5. Quantitative real-time PCR

RNA was extracted from FFPE samples using the High Pure RNA Purification Kit and following the manufacturer's instructions (Roche,

Mannheim, Germany). Two 10- μ m sections of each tissue sample were used, adjacent to the slides used for histological characterization. The maximum volume of RNA (11 μ l, mean RNA concentration: 17.1 ± 10.3 ng/ μ l) was converted into complementary DNA using the RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany). The polymerase chain reaction (PCR) was detected using the fluorescent dye SYBR Green (KAPA SYBR Fast Universal, peqLab, Erlangen, Germany). Twelve QuantiTect Primer Assays from Qiagen (Hilden, Germany) were used for quantification of the individual methyltransferases and acetyltransferases: SUV39H1/2 (Hs_SUV39H1_1_SG, 108 bp), ESET/SETDB1 (Hs_SETDB1_1_SG, 110 bp), EHMT1 (Hs_EHMT1_1_SG, 110 bp), EZH2 (Hs_EZH2_1_SG, 112 bp), G9a (Hs_EHMT2_1_SG, 97 bp), MLL2/4 (Hs_MLL_2_SG, 76 bp), hSET1A (Hs_KIAA0339_1_SG, 74 bp), SET7/9 (Hs_SET7_1_SG, 163 bp), GCN5L (Hs_KAT2A_1_SG, 88 bp), P300 (Hs_EP300_1_SG, 72 bp), MYST1 (Hs_KAT8_1_SG, 94 bp), and MYST2 (Hs_KAT7_1_SG, 78 bp). All these primers are commercially optimized for SYBR Green-based PCR reactions. Quantitative real-time PCR was performed in three steps: 95°C for 10 s, 60°C for 30 s, 72°C for 10 s, and 45 cycles. An additional step of 77°C for 15 s was included to eliminate primer dimers. The quality of the PCR reaction was checked by melting curve analysis in all cases and only PCR reactions with a proper melting curve were used for data analysis. All results were normalized for the expression of GAPDH (Hs_GAPDH_1_SG, NM_001256799, 95 bp, Qiagen) and beta-actin (Hs_ACTB_1_SG, 146 bp; Qiagen). The overall correlation between the two housekeeping genes GAPDH and beta-actin was $r=0.917$ ($R^2=0.840$, $P<.001$). No significant differences were observed between the individual data, independent of the housekeeping gene used for normalization.

2.6. Statistical analysis

All data were analyzed using SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Values of continuous variables were compared using two-tailed Student's *t* tests and ANOVA for normal distributed samples or nonparametric Mann–Whitney *U* test and Kruskal–Wallis tests for nonnormally distributed values. All data achieved from immunohistochemical and expression analyses are shown as box plot diagrams showing the median and the 25th/75th percentile range. Differences with *P* values $<.05$ were considered to be statistically significant. Furthermore, logistic regression analysis and adjustment for age and sex were performed to evaluate the influence of drugs on the expression of the methyltransferases and acetyltransferases. All analyses were done in duplicate, and in the case of heterogeneous results, the experiment was repeated one further time.

3. Results

3.1. Histological analysis and characterization of the study groups

In order to assign the specimens to either early (types I–III) or advanced stage (types V–VII) of atherosclerosis, the plaques were first characterized by means of histology and immunohistochemistry. Furthermore, immunohistochemistry was used in order to differentiate the four main cell types in atherosclerotic lesions (endothelial cells, lymphocytes, macrophages, and SMCs). Types I–III of atherosclerosis showed a majority of fibrous connective tissue, with increased thickness of the intima layer due to the accumulation of collagen fibers and glycosaminoglycans, an enhanced number of macrophages, and small extracellular deposits of lipids scattered throughout the intima. In advanced stages of atherosclerosis types V–VII, a significantly increased amount of macrophages and lymphocytes was observed. Furthermore, fibrous connective tissue, mainly without any regularity, was dispersed heterogeneously throughout the vessel wall, and thrombotic deposits were visible to some extent, some even with hemorrhages, necrosis of the lipid core, and calcification.

3.2. Histological analysis of histone acetylation

With regard to the histone modifications selected in our study (H3K4, H3K9, and H3K27), position K4 was not acetylated. Therefore, only H3K9 and H3K27 were analyzed for acetylation by semiquantitative evaluation of staining intensity in the individual cells within the atherosclerotic plaques (Fig. 1). In all cases, consecutive staining was performed for each cell type followed by immunohistochemistry for acetylation. In atherosclerotic lesions, H3K9 and H3K27 showed significant increases in staining intensity compared with healthy controls in all cell types (Fig. 2). Acetylation of H3K9 increased significantly with plaque progression in SMCs ($P=.048$) and macrophages ($P<.001$), comparing early and advanced stages of atherosclerosis. Similar results were also observed between control tissue and early stages of atherosclerosis for both cell types ($P=.002$ and $P=.034$, respectively). Furthermore, a significant increase in acetylation at position K9 on histone H3 was observed in atherosclerosis (both early and advanced) in endothelial cells and lymphocytes ($P<.001$ in both cases) compared to controls. A similar pattern was found for acetylation of H3K27, with a significant increase during the progression of atherosclerosis (early versus advanced stage) for macrophages ($P=.034$) and also when comparing atherosclerotic lesions with healthy controls for SMCs ($P=.041$) and endothelial cells ($P<.001$) (Fig. 2).

3.3. Quantitative expression analysis of HATs

To determine the corresponding HAT expression level, mRNA was quantified via real-time PCR from FFPE tissue samples adjacent to the histological specimens as described above. Expression of the acetyltransferase GCN5L, which is a part of the GNAT group, was significantly increased in advanced stage atherosclerotic plaques compared to early stage plaques (7.6-fold, $P=.001$) and thus was correlated with the progression of atherosclerosis (Fig. 3). However, it should be noted that the expression of GCN5L was about 30- to 50-fold lower compared to that of GAPDH. No expression of GCN5L was detected in the control carotid arteries. Expression of P300 (representative of the P300/CPB group) was also detected in carotid atherosclerosis, but no significant differences were observed between the study groups. The expression was also very low reaching only 1/100 of the GAPDH mRNA expression level. Of the HATs of the MYST group tested in our study, only MOF (MYST1) was detected. It was expressed exclusively in atherosclerotic lesions without any significant differences between early and advanced stages (Fig. 3). The expression of MYST1 was about 100- to 1000-fold lower than that of the housekeeping GAPDH gene. No expression was observed in healthy vessels. Expression of MYST2 was not detected in control tissue samples or in atherosclerotic lesions.

To elucidate the potential influence of drugs such as statins, ACE inhibitors, or beta-blockers on the expression of HATs, logistic regression analysis was performed (Table 2). No significant differences were observed between the groups with or without the drug treatment. Interestingly, however, the OD ratio for GCN5L and statins, as well as for P300 and ACE inhibitors, was markedly increased (OD=45, 95% CI 0.003–5937, $P=.430$ and OD=32, 95% CI 0.018–5863, $P=.364$; respectively). For P300 and statins or beta-blockers, the OD ratio was markedly decreased (OD=0.005, 95% CI 0.003–11.53, $P=.181$ or OD=0.020, 95% CI 0–69.09, $P=.348$; respectively). However, the result was not statistically significant due to the broad heterogeneity of the individual values. We could not analyze MYST1 because the data did not pass the likelihood-ratio test.

3.4. Histological analysis of histone methylation

Semiquantitative histological analysis of histone methylation was performed in a similar manner as for histone acetylation described above (Fig. 4). With the progression of atherosclerosis, the methylation of H3 at position K9 was significantly reduced in SMCs ($P<.001$) and

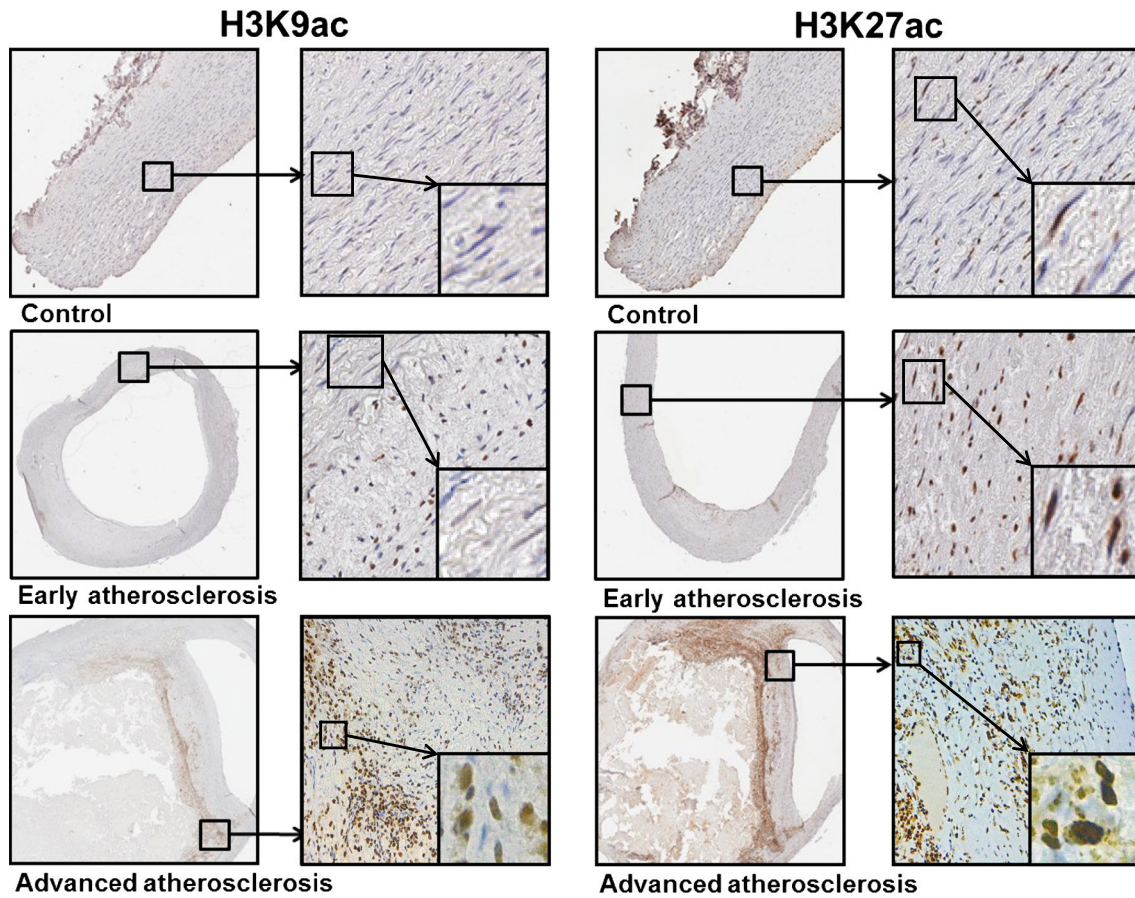


Fig. 1. Representative images of immunochemical evaluation of acetylated H3K9 and H3K27 comparing staining intensity of controls, early and advanced stage of atherosclerotic carotids. The highest observed staining intensity for each individual antibody used was set as 1.0.

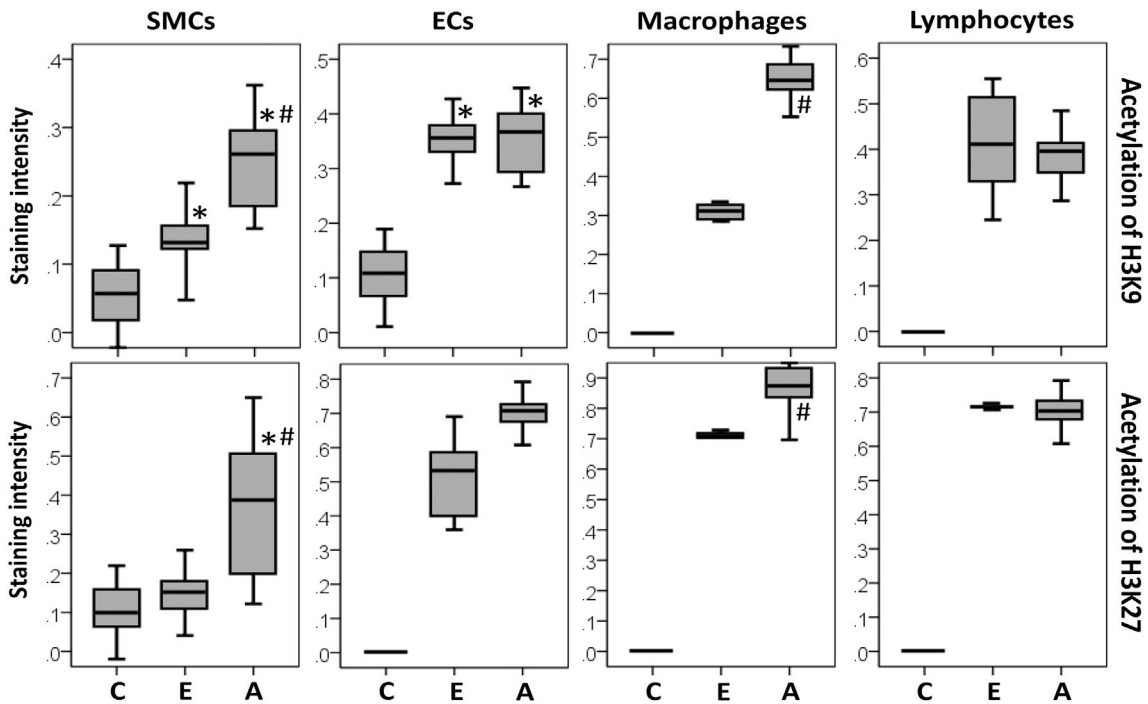


Fig. 2. Semiquantitative histological analysis of acetylation of H3K9 (upper row) and H3K27 (lower row) in different cell types within atherosclerotic lesions: SMCs, endothelial cells (ECs), macrophages, and leukocytes in different stages of atherosclerosis. C, control healthy carotid vessel; E, early stage of atherosclerosis; A, advanced stage of atherosclerosis; quantification range lays between 0=no staining and 1=maximal observed staining intensity; * $P < .05$ between C and E or between C and A (performed only for SMCs and ECs), # $P < .05$ between E and A.

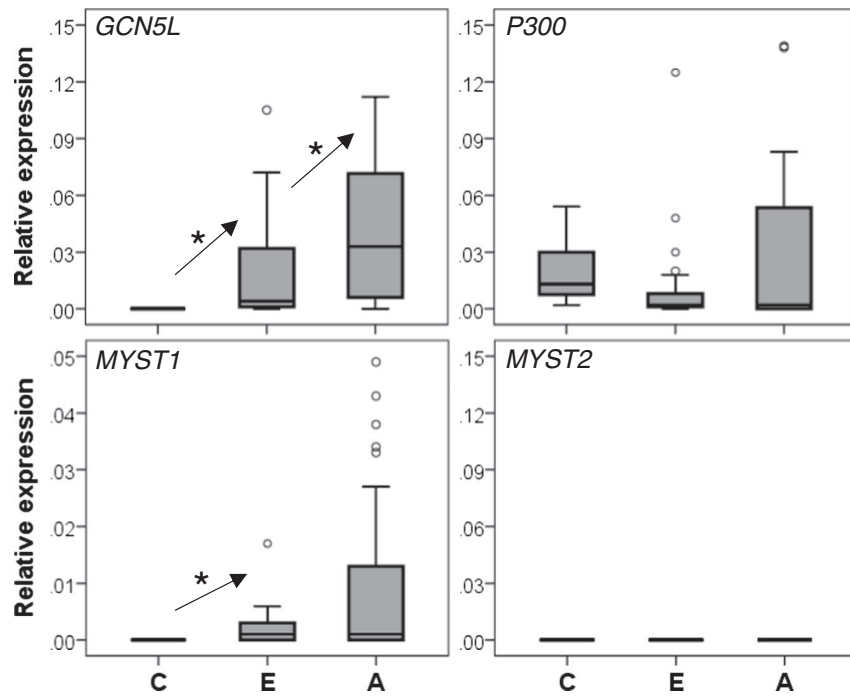


Fig. 3. Quantitative expression analysis of HATs at mRNA level in atherosclerotic lesions and healthy carotid vessels. C, control healthy vessel; E, early stage of atherosclerosis; A, advanced stage of atherosclerosis; PCR analysis and quantification were performed by SYBR Green-based real-time PCR and normalized to the expression of GAPDH and beta-actin; * $P < .05$.

leukocytes ($P = .026$). Comparing control vessels and advanced atherosclerotic plaques, significant reduction of histone methylation was found only for SMCs ($P < .001$) (Fig. 4). We did not include a comparison between control tissue and atherosclerotic lesions for macrophages and lymphocytes because these cells were not detected in healthy carotid vessels. Opposite results were found for the methylation of H3K27, where the staining intensity of macrophages and lymphocytes was significantly decreased in advanced compared to early stage of atherosclerosis ($P = .013$ and $P = .026$, respectively) (Fig. 4). For SMCs, the intensity of staining for H3K27 was already decreased in atherosclerotic lesions at early stage of atherosclerosis ($P < .027$). No further changes were observed in these cells between the different stages of atherosclerosis. In contrast to H3K9 and H3K27, the methylation of H3K4 was significantly increased between early and advanced stages of atherosclerosis only in SMCs ($P = .016$) (Fig. 4). Comparing the state of methylation at position K4 of histone H3 between atherosclerotic lesions and healthy controls, methylation was increased in SMCs ($P = .047$) as well as in endothelial cells ($P = .005$). As mentioned above, we did not include the comparison between control tissue and

atherosclerotic lesions for macrophages and lymphocytes because these cells were mostly absent in healthy carotid vessels.

3.5. Quantitative expression analysis of histone methyltransferases (HMT)

From the eight selected HMTs responsible for methylation of H3K4, H3K9, and H3K27, expression was detected for only two of them (Fig. 5). MLL2/4, methylating H3K4, showed a significant increase of expression in advanced carotid plaques compared to early stages of atherosclerosis ($P < .001$). No differences were observed between the control vessels and atherosclerotic lesions. It should be mentioned that, in our case, the expression of MLL2/4 in healthy carotid vessels, as well as in early stage of atherosclerosis, was very heterogeneous. The methyltransferase G9a was expressed in all tissue samples without any significant differences between the study groups. Interestingly, compared with the expression of HATs, the expression of MLL2/4 and G9a was about 100- to 1000-fold higher, achieving similar level to GAPDH. For the methylation of H3K9, no expression any of the three HMTs (SUV39H1/2, ESET/SETDB1, and EHMT1) analyzed in our study was detected.

4. Discussion

Although a number of review articles have already pointed out the potential role of epigenetics in atherosclerosis and cardiovascular disease, original work is still sparse [17–19]. Our results confirm the assumption that epigenetics is involved, showing significant changes in histone acetylation and methylation between healthy vessels and atherosclerotic lesions. Furthermore, some of the epigenetic factors tested in our study changed with the severity of atherosclerosis. Modifications of histones, especially their state of acetylation and methylation, are closely related to the regulation of gene expression [6,7]. Acetylation of histone lysine residues generally leads to gene activation and plays an important role during development and differentiation [3–5]. Imbalances in the activity of HATs or deficiencies in their function may alter the acetylation pattern of histones and thus cause pathological changes within the vessel wall, consequently facilitating the initiation and/or progression of atherosclerosis [19]. The most important histone

Table 2
Logistic regression analysis of the expression of acetyltransferases and methyltransferases as a function of drug treatment

		OD ratio	95% CI		P value
Statins	MLL2/4	0.973	0.729	1.299	.852
	G9a	1.007	0.685	1.480	.972
	GCN5L	45.50	0.003	5937	.430
	P300	0.005	0.000	11.53	.181
ACE inhibitors	MLL2/4	0.929	0.697	1.238	.615
	G9a	1.129	0.795	1.603	.497
	GCN5L	3.478	0.003	4332	.732
	P300	32.26	0.018	5863	.364
Beta-blocker	MLL2/4	0.808	0.600	1.089	.161
	G9a	0.710	0.479	1.051	.087
	GCN5L	71.75	0.035	14558	.271
	P300	0.020	0.000	69.09	.348

All values were adjusted for age and sex.

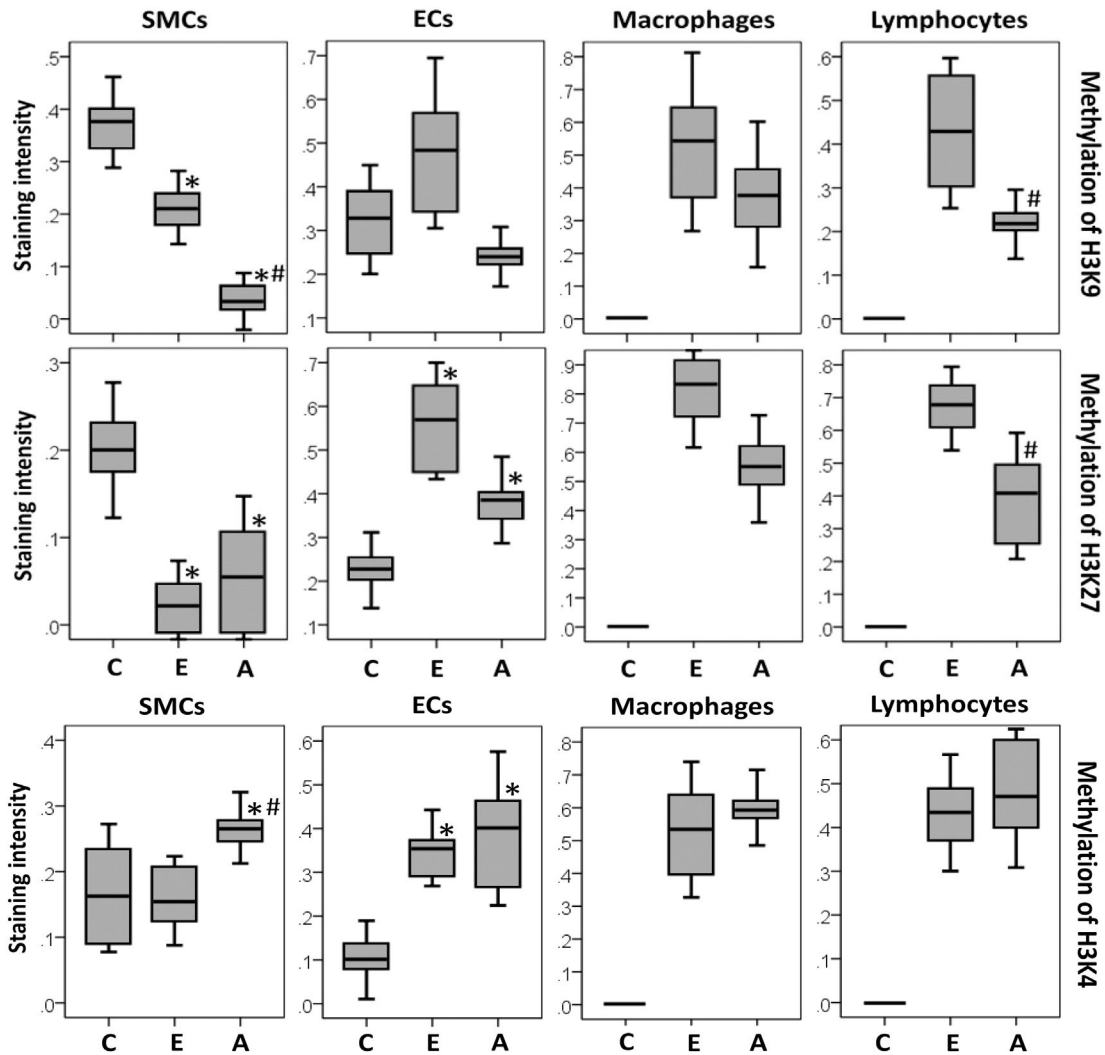


Fig. 4. Semiquantitative histological analysis of methylation of H3K9 (first row), H3K27 (second row), and H3K4 (third row) in different cell types within atherosclerotic lesions: SMCs, endothelial cells (ECs), macrophages, and leukocytes in different stages of atherosclerosis. C, control healthy carotid vessel; E, early stage of atherosclerosis; A, advanced stage of atherosclerosis; quantification range lays between 0=no staining and 1=maximal observed staining intensity; * $P < .05$ between C and E or between C and A (performed only for SMCs and ECs), # $P < .05$ between E and A.

modifications, which lead to significant changes in chromatin structure and consequently influence gene activity, are at positions K4, K9, and K27 on histone H3 [1,3,7]. Of the four cell types abundant in the atherosclerotic lesions investigated in our study, SMCs and macrophages especially showed higher acetylation levels of H3K9 and H3K27, which leads to increased gene transcription [6,7]. Regarding the enhanced state of acetylation in SMCs in atherosclerotic lesions, our results were in accordance with those of Findeisen et al., who demonstrated that proliferation of SMCs in vitro can be reduced by HDAC inhibitors [9]. Furthermore, Fish and colleagues found that hyperacetylation of H3K9 affects the expression of eNOS, which plays a critical role in the maintenance of the proper function of endothelial cells [20]. Our data support these findings, showing higher levels of H3K9 acetylation in endothelial cells of the neovessels within carotid atherosclerotic plaques compared with healthy carotid arteries. The significant increase in acetylation at the lysine residue K27 of histone H3 may indicate a potential role of this site in the activation of endothelial cells. According to our results, it seems that especially macrophages, which are closely associated with the pathogenesis of atherosclerosis, are being regulated via acetylation and thus deserve further examination. Regarding the enzymes with HAT activity, GCN5L might play a potential role in the development or progression of atherosclerosis, as it showed significant increase in gene expression in atherosclerotic lesions compared to healthy arteries.

Furthermore, the expression of GCN5L was associated with the severity of atherosclerosis. GCN5L belongs to the GNAT family of proteins and is known to act as a coactivator of various transcriptional factors. It acetylates different lysine residues, with a preference for histone H3 [5,21]. Another HAT with increased expression in atherosclerotic lesions was MYST1, belonging to the family of MYST acetyltransferases. The major function of MYST is transcriptional regulation of gene expression [22]. The MYST proteins are the largest but the least understood family of HATs. Their role is supposed to be in regulating cellular processes such as apoptosis, the cell cycle, and development [22]. MYST1 has also been implicated in DNA transcription and repair [23]. In contrast, expression of MYST2, which possesses broader substrate specificity than MYST1, was not detected in our study. The expression of P300 as a representative of the P300/CREB-binding protein-associated factor group (PCAF) of HATs was also detected in carotid atherosclerotic lesions. However, no significant differences were observed between the study groups. The P300 protein is a close homolog of CREB-binding protein and forms part of transcriptional regulatory complexes with multiple acetyltransferase activities [24]. Its substrate specificity is very broad including H3, H4, H2A, H2B, and nonhistone proteins. The low substrate specificity and membership of various transcription complexes could explain the fact that we did not observe any differences in the expression of P300 gene between healthy vessels and carotid atherosclerotic

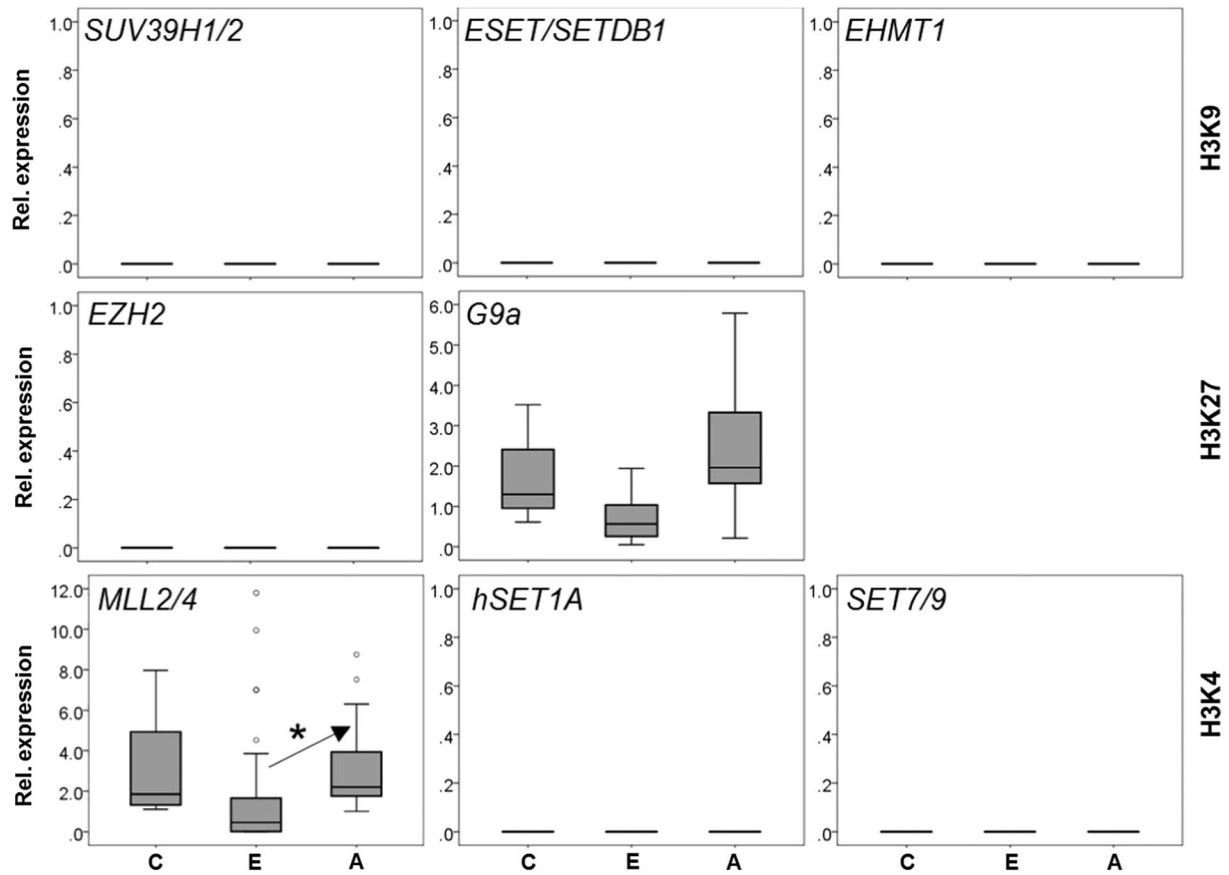


Fig. 5. Quantitative expression analysis of HMTs at mRNA level in atherosclerotic lesions and healthy carotid vessels. E, early stage; A, advanced stage of atherosclerosis; C, control vessel. PCR analysis and quantification were performed by SYBR Green-based real-time PCR and normalized to the expression of GAPDH and beta-actin; * $P < .05$.

plaques. Furthermore, it should be noted that the expression of the HATs in atherosclerotic carotid plaques analyzed in our study was very low, only 1/30 to 1/100 of the expression level of GAPDH, and even lower in some cases. In addition, these low expression levels were accompanied by high heterogeneity within each study group. Therefore, it remains to be elucidated how far the changes in the expression of HATs in atherosclerotic carotid arteries contribute to the lesion progression.

In contrast to acetylation that generally leads to gene activation, the methylation of histones is able to either activate or inhibit gene transcription depending upon the site of methylation [1]. In the current study, we observed significant changes in the methylation state of all three lysine residues (H3K4, H3K9, and H3K27) in atherosclerosis in comparison with healthy vessels. Methylation of H3K9 and H3K27 was significantly reduced particularly in SMCs and lymphocytes. In contrast, methylation of H3K4 was increased in SMCs. Furthermore, methylation of H3 at position K9 continuously declined with the progression of atherosclerosis, again especially in SMCs. All three of the lysine residues K4, K9, and K27 were modified in a manner which facilitates gene expression [6]. SMCs are important cells within the vessel wall, maintaining its stability and proper function [25]. Due to mechanical injury or lipid accumulation during progression of atherosclerosis, for example, SMCs change their phenotype, starting to synthesize various components of the arterial wall such as collagen and proteoglycans. Within the fibrous cap, overlying atherosclerotic plaques, SMCs play a critical role in lesion vulnerability [25]. The synthetic phenotype of SMCs is double-edged. On the one hand, SMCs stabilize the vessel wall and fibrous cap by overproduction of new collagen fibers. On the other hand, these cells also overexpress various matrix metalloproteinases and inflammatory factors, thus promoting plaque instability [26]. In this context, our data suggest that changes in the methylation state, especially of H3K4 and H3K9, may play a decisive role in the activation of

SMCs in atherosclerosis. In contrast, methylation of H3K9 and H3K27 may be of importance in macrophage activation [27]. Our results also indicate a role for epigenetics in other inflammatory cells such as lymphocytes in the promotion of atherosclerosis.

Histone methylation is accomplished by HMTs. These transferases are much more specific for the individual lysine residues than HATs. Of all of the HMTs analyzed in our study, however, we were able to detect expression of only two, MLL2/4, specific for the methylation of H3K4 and G9a, methylating H3K9 and partially H3K27. Thus, MLL2/4 may be responsible for the maintenance of H3K4 methylation in atherosclerosis [28]. Interestingly, no differences were observed in the expression of MLL2/4 between control carotid vessels and atherosclerotic plaques. A possible explanation for this discrepancy could be the abundance and phenotypic changes of SMCs. While in healthy vessels, SMCs are the predominant cells, and of a contractile phenotype, in atherosclerotic lesions, the proportion of SMCs is markedly reduced and replaced by different kinds of inflammatory cells. Furthermore, SMCs in atherosclerotic plaques are frequently of synthetic phenotype. Regarding HMTs specific for H3K9 and H3K27, only methyltransferase G9a was detected; however, there were no significant differences between the study groups. Methylation at lysine residues K9 and K27 generally leads to gene inactivation; thus, low or no detectable expression of the responsible HMTs would be in this case also plausible.

Study limitations: because little is known about histone modifications in atherosclerosis, in the current work, we selected only representative histone acetylation and methylation sites, which were already well described as influencing chromatin structure and gene transcription. We also analyzed only well-known representatives of the corresponding acetyltransferases or methyltransferases. There are still other modifying enzymes and other lysine residues on histones that may also play an important role in atherosclerosis, which we did not

investigate. Furthermore, the expression of transferases does not necessarily correlate with the state of methylation or acetylation, as there are also histone demethylases and deacetylases, which we did not analyze in our study [2,3]. In addition, it should be noted that our association of histone acetylation and methylation with the individual cell types within the carotid atherosclerotic plaques (Figs. 2 and 4) was performed semiquantitatively on consecutive staining, which may introduce bias, even though two experienced investigators characterized and evaluated the plaques. Furthermore, we analyzed histone acetylation and methylation in adjacent slides stained with the corresponding markers for the individual cells, which could also lead to discrepancies in the results.

In conclusion, our results show significant changes in histone acetylation and methylation in carotid atherosclerotic lesions in comparison with healthy vessels. Furthermore, significant relationships were observed between expression of some of the corresponding transferases and the severity of the atherosclerosis. Thus, epigenetics might be involved in the development of atherosclerotic lesions and may serve as potential indicator of plaque progression and/or vulnerability. Further studies are necessary to confirm the relevance of epigenetics in atherosclerosis.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.carpath.2015.11.001>.

Conflicts of interest

None.

References

- [1] Szyf M. Epigenetics, DNA methylation, and chromatin modifying drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2009;49:243–63.
- [2] Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 2004;429:457–63.
- [3] Huidobro C, Fernandez AF, Fraga MF. The role of genetics in the establishment and maintenance of the epigenome. *Cell Mol Life Sci* 2013;70:1543–73.
- [4] Eglén RM, Reisine T. Screening for compounds that modulate epigenetic regulation of the transcriptome: an overview. *J Biomol Screen* 2011;16:1137–52.
- [5] Roth SY, Denu JM, Allis CD. Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem* 2001;70:81–120.
- [6] Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res* 2011;21:381–95.
- [7] Fischle W. Talk is cheap – cross-talk in establishment, maintenance, and readout of chromatin modifications. *Genes Dev* 2008;22:3375–82.
- [8] Boubou Y, Issa JP. Epigenetics in cancer: what's the future? *Oncology* 2011;25:220.
- [9] Findeisen HM, Gizard F, Zhao Y, Qing H, Heywood EB, Jones KL, et al. Epigenetic regulation of vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation by histone deacetylase inhibition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;31:851–60.
- [10] Zhang DH, Wen XM, Zhang L, Cui W. DNA methylation of human telomerase reverse transcriptase associated with leukocyte telomere length shortening in hyperhomocysteinemia-type hypertension in humans and in a rat model. *Circ J* 2014;78:1915–23.
- [11] Schleithoff C, Voelker-Mahlknecht S, Dahmke IN, Mahlke U. On the epigenetics of vascular regulation and disease. *Clin Epigenetics* 2012;4:7.
- [12] Zhang Y, Qiu J, Wang X, Zhang Y, Xia M. AMP-activated protein kinase suppresses endothelial cell inflammation through phosphorylation of transcriptional coactivator p300. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;31:2897–908.
- [13] Yan MS, Matouk CC, Marsden PA. Epigenetics of the vascular endothelium. *J Appl Physiol* 2010;109:916–26.
- [14] Sary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 1995;92:1355–74.
- [15] Sary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W, Rosenfeld ME, et al. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 1994;89:2462–78.
- [16] Sary HC. Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1177–8.
- [17] Webster AL, Yan MS, Marsden PA. Epigenetics and cardiovascular disease. *Can J Cardiol* 2013;29:46–57.
- [18] Pelisek J, Eckstein HH, Zernecke A. Pathophysiological mechanisms of carotid plaque vulnerability: impact on ischemic stroke. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2012;60:431–42.
- [19] Turunen MP, Aavik E, Ylä-Herttuala S. Epigenetics and atherosclerosis. *Biochim Biophys Acta* 1790;2009:886–91.
- [20] Fish JE, Matouk CC, Rachlis A, Lin S, Tai SC, D'Abreo C, et al. The expression of endothelial nitric-oxide synthase is controlled by a cell-specific histone code. *J Biol Chem* 2005;80:24824–38.
- [21] Vetting MW, de Carvalho LP S, Yu M, Hegde SS, Magnet S, Roderick SL, et al. Structure and functions of the GNAT superfamily of acetyltransferases. *Arch Biochem Biophys* 2005;433:212–26.
- [22] Thomas T, Voss AK. The diverse biological roles of MYST histone acetyltransferase family proteins. *Cell Cycle* 2007;6:696–704.
- [23] Taipale M, Rea S, Richter K, Vilar A, Lichter P, Imhof A, et al. hMOF histone acetyltransferase is required for histone H4 lysine 16 acetylation in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 2005;25:6798–810.
- [24] Sterner DE, Berger SL. Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000;64:435–59.
- [25] Lacolley P, Regnault V, Nicoletti A, Li Z, Michel JB. The vascular smooth muscle cell in arterial pathology: a cell that can take on multiple roles. *Cardiovasc Res* 2012;95:194–204.
- [26] Alexander MR, Owens GK. Epigenetic control of smooth muscle cell differentiation and phenotypic switching in vascular development and disease. *Annu Rev Physiol* 2012;74:13–40.
- [27] De Santa F, Totaro MG, Prosperini E, Notarbartolo S, Testa G, Natoli G. The histone H3 lysine-27 demethylase Jmjd3 links inflammation to inhibition of polycomb-mediated gene silencing. *Cell* 2007;130:1083–94.
- [28] Andreu-Vieyra CV, Chen R, Agno JE, Glaser S, Anastassiadis K, Stewart AF, et al. MLL2 is required in oocytes for bulk histone 3 lysine 4 trimethylation and transcriptional silencing. *PLoS Biol* 2010;8. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.1000453>.

Alternation of histone and DNA methylation in human atherosclerotic carotid plaques

Anna Greißel^{1*}; Mihaela Culmes^{1*}; Rudolf Napieralski²; Ernst Wagner³; Harry Gebhard⁴; Manfred Schmitt²; Alexander Zimmermann¹; Hans-Henning Eckstein^{1,5}; Alma Zerneck^{1,5,6#}; Jaroslav Pelisek^{1#}

¹Department of Vascular and Endovascular Surgery, Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München, Germany; ²Frauenklinik; Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München, Germany; ³Department of Pharmacy, Center for Drug Research, Ludwig-Maximilians-University Munich, Germany; ⁴Department of Trauma Surgery, BG Unfallklinik Tübingen, University of Tübingen, Germany; ⁵DZHK (German Centre for Cardiovascular Research), partner site Munich Heart Alliance, Munich, Germany; ⁶Institute of Clinical Biochemistry and Pathobiochemistry, University Hospital Würzburg, University of Würzburg, Würzburg, Germany

Summary

Little is known about epigenetics and its possible role in atherosclerosis. We here analysed histone and DNA methylation and the expression of corresponding methyltransferases in early and advanced human atherosclerotic carotid lesions in comparison to healthy carotid arteries. Western Blotting was performed on carotid plaques from our biobank with early (n=60) or advanced (n=60) stages of atherosclerosis and healthy carotid arteries (n=12) to analyse di-methylation patterns of histone H3 at positions K4, K9 and K27. In atherosclerotic lesions, di-methylation of H3K4 was unaltered and that of H3K9 and H3K27 significantly decreased compared to control arteries. Immunohistochemistry revealed an increased appearance of di-methylated H3K4 in smooth muscle cells (SMCs), a decreased expression of di-methylated H3K9 in SMCs and inflammatory cells, and reduced di-methylated H3K27 in inflammatory cells in advanced versus early atherosclerosis. Expression of corresponding histone methyltransferases MLL2 and G9a was increased in advanced versus early atherosclerosis.

Genomic DNA hypomethylation, as determined by PCR for methylated LINE1 and SAT-alpha, was observed in early and advanced plaques compared to control arteries and in cell-free serum of patients with high-grade carotid stenosis compared to healthy volunteers. In contrast, no differences in DNA methylation were observed in blood cells. Expression of DNA-methyltransferase DNMT1 was reduced in atherosclerotic plaques versus controls, DNMT3A was undetectable, and DNMT3B not altered. DNA-demethylase TET1 was increased in atherosclerotic plaques. The extent of histone and DNA methylation and expression of some corresponding methyltransferases are significantly altered in atherosclerosis, suggesting a possible contribution of epigenetics in disease development.

Keywords

Carotid artery, atherosclerosis, epigenetics, DNA and histone methylation, methyltransferases

Correspondence to:

Jaroslav Pelisek, PhD, or Alma Zerneck, MD
Department of Vascular and Endovascular Surgery
Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München
Ismaninger Str. 22, D-81675 Munich, Germany
Phone: 0049-89-4140-5168, Fax: 0049-89-4140-4861
E-mail: J.Pelisek@lrz.tum.de, or alma.zerneck@uni-wuerzburg.de

Received: October 13, 2014

Accepted after major revision: February 25, 2015

Epub ahead of print: May 21, 2015

<http://dx.doi.org/10.1160/TH14-10-0852>

Thromb Haemost 2015; 114: ■■■

* and #, equal contribution.

Introduction

Pathophysiological changes in gene expression represent the basis of various human diseases. Epigenetics has been revealed to be an ancient and powerful tool to activate or silence genes (1–4). The basic unit of chromatin consists of DNA wrapped around histone cores, consisting of an octamer formed by two of each of the following histones H2A, H2B, H3, and H4. Histone methylation constitutes an important epigenetic mechanism that leads to changes in chromatin structure and in consequence regulating gene expression (3). Although DNA and histone methylation require different sets of enzymes, there seems to be a close interrelation between these processes in modulating gene transcription

(4–6). While histone methylation can facilitate DNA methylation, DNA methylation in turn may serve as a template for specific histone modifications (4, 6). Recent evidence indicates that both modifications may be accomplished through direct interactions between histone and DNA methyltransferases (6). Among the most important histone methylation sites described so far, methylation at positions K4, K9, and K27 on histone H3 not only leads to changes in chromatin structure and alternations in gene expression, it can also influence the state of DNA methylation (3, 4, 7).

While methylation patterns remain relatively stable in the adult organism, they may alter significantly in certain diseases (8–11). Notably, a role of epigenetics as a potential mechanism to control

gene expression has recently been proposed also in cardiovascular disease (12–15). For instance, aberrant DNA methylation has been associated with changes in the transcription of a variety of pro-atherogenic genes (13). However, there is only limited insight into epigenetic alterations in human atherosclerosis. Hypomethylation of the repetitive DNA sequence LINE-1 has been identified in atherosclerotic lesions (9) and seems to correlate with higher serum levels of vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 (16, 17). While these studies suggest that epigenetics may play an important role in atherosclerosis, epigenetic changes have not yet been analysed at different stages of atherosclerotic plaque formation.

DNA methylation is conducted by three methyltransferases (DNMTs), DNMT1, 3A, and 3B. DNMT1 maintains DNA methylation and is responsible for the propagation of DNA methylation patterns during mitotic cell division, guiding the methylation of CpG dinucleotides on the new DNA strand according to the methylation status of the complementary template strand (2, 16, 18). In contrast, DNMT3A and 3B are catalysing *de novo* methylation and are important in the establishment of methylation patterns during development. In addition, DNMT3A and 3B were shown to correlate with changes in histone modifications (2, 18). In mice, deletion of DNMT3B reduced the methylation of CpG islands on repetitive sequences, such as LINE1 and Sat- α , and activated gene expression on the inactive X-chromosome (18). So far, no data on the expression of DNMTs in atherosclerotic lesions are available.

Therefore, the aim of the present study was to analyse histone and DNA methylation and the expression of corresponding methyltransferases at different stages of atherosclerosis in carotid arteries compared to healthy vessels.

Material and methods

Study population

Atherosclerotic plaques and serum were obtained from patients with high-grade carotid artery stenosis (>70%) (19) after carotid endarterectomy (CEA), collected in our Biobank (n=120). The average age of the patients was 69.9 ± 9.3 years. Tissue specimen mainly consisted of the diseased intima as a consequence of the surgical intervention used for plaque excision. Control carotid arteries (n=12) were obtained from patients undergoing trauma surgery. The average age of control patients was 56.9 ± 8.9 years (8 males, 4 females). These tissue samples comprised all three vessel layers, i.e. the intima, media, and adventitia. Control vessels did not contain any atherosclerotic lesions; in some cases a slightly thickened intima was observed. Serum samples of healthy volunteers (n=10) were included as controls for blood analysis. The study was performed according to the Guidelines of the World Medical Association Declaration of Helsinki. The local ethics committee of our university hospital approved the study, and written informed consent to being included in the Biobank was given by all patients. The baseline patients characteristics is summarised in Supplementary Table 1. No significant differences were

observed between study groups with the exception of the use of beta-blockers, which was higher in carotid patients that served as donors for plaques with early compared to the advanced atherosclerosis.

Histology and plaque characterisation

Carotid plaques were segmented in blocks of 3–4 mm and freshly frozen in liquid nitrogen or fixed in formalin and embedded in paraffin (FFPE). Haematoxylin-Eosin and Elastica van Gieson staining were performed in order to assess the stage/type of atherosclerosis. Histological classification of carotid atherosclerotic lesions was performed as described by Sary et al. and approved by the American Heart Association (20, 21) by two independent investigators blinded for the study in close collaboration with an experienced pathologist. Study specimens were divided into groups of early (stage I–III, n=60) and advanced atherosclerosis (stage V–VII, n=60). Type I, II, and III lesions were characterised by a markedly thickened intima, fatty streaks and increased of macrophages/macrophage-derived foam cells (Suppl. Figure 1A, available online at www.thrombosis-online.com). Type V lesion showed massive aggregates of extracellular lipids forming a necrotic/lipid core under a fibrous cap, and increased amounts of leukocytes, macrophages/macrophage-derived foam cells; type VI lesion were similar to lesion stage V with thrombotic deposits and/or marked haemorrhage; type VII lesion displayed calcium deposits (Suppl. Figure 1B, available online at www.thrombosis-online.com).

Western blot analysis

Complete segments of fresh carotid tissue samples were homogenised in liquid nitrogen, suspended in lysis buffer and histone extraction was performed in accordance with the manufacturer's protocol (EpiSeeker Histone Extraction Kit, Abcam, Cambridge, UK). Protein quantification was performed by reading the optical density at 560 nm using the BCA Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA). Equal amounts of extracted histone proteins were then separated by a 15% SDS-PAGE and blotted onto a PVDF membrane. The membrane was blocked by 5% non-fat dry milk in TBS solution (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl) for 1 hour and consecutively incubated with primary antibodies overnight at 4°C: rabbit monoclonal H3K4 (Methyl-Histone H3 Antibody Sampler Kit; New England Biolabs, Frankfurt am Main, Germany; dilution 1:500; Cat. 9847S), rabbit monoclonal H3K9 (New England Biolabs; dilution 1:500; Cat. 9847S), rabbit monoclonal H3K27 (New England Biolabs; dilution 1:500; Cat. 9847S), rabbit monoclonal H3 (D1H2) (New England Biolabs; dilution 1:500; Cat. 9847S), followed by a secondary antibody for one hour (goat anti-rabbit IgG, TR-001-HR, Thermo Scientific; dilution 1:10,000).

Proteins were visualised by a chemiluminescent detection method (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) using Kodak Scientific Imaging film. The developed film was digitalised and protein

quantification was performed using free software ImageJ 1.44p (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Following normalisation to GAPDH, the average of the control tissue samples was set as 100% and results were calculated in comparison.

Immunohistochemistry (IHC)

Carotid artery tissue sections were characterised by immunostaining, using specific antibodies to detect macrophages/monocytes (anti-CD68, mouse monoclonal, clone KP1, dilution 1:2,000; Dako, Glostrup, Denmark; Cat. M0814) and leukocytes (anti-CD45, clone 2B11, dilution 1:100; Dako; Cat. M0701). For proper detection of smooth muscle cells (SMCs), we tested three different antibodies directed against smooth muscle actin (SMA, mouse monoclonal, clone HHF35, dilution 1:200; Dako; Cat. M0635), smooth muscle myosin heavy chain 1 and 2 (SM-MHC1+2, rabbit monoclonal, dilution 1:4,000; abcam; Cat. ab124679), and smoothelin (mouse monoclonal, dilution 1:100; abcam; Cat. ab21108). No significant differences were observed between anti SM-actin and SM-MHC1+2. In contrast, staining for smoothelin was weaker. For these reasons and in accordance with our previous studies (22–24) we used SM-actin staining to identify SMC in the current work.

Immunohistochemical detection of methylation of histone H3 at specific sites H3K4, H3K9, and H3K27 was performed using the following antibodies: anti-di-methyl-histone H4(Lys4) (rabbit monoclonal, dilution 1:3,000; New England Biolabs; Methyl-Histone H3 AK Sampler Kit; Cat. 9847S), anti-di-methyl-histone H4(Lys9) (rabbit monoclonal, dilution 1:200; New England Biolabs; Cat. 9847S), anti-di-methyl-histone H4(Lys27) (rabbit monoclonal, dilution 1:200; New England Biolabs; Cat. 9847S).

Following primary antibody incubation, smooth muscle actin was visualised using the APAAP ChemMate Detection Kit (rabbit anti-mouse; Dako) according to the manufacturer's instructions. All other primary antibodies were detected by LSAB ChemMate Detection Kit (biotinylated goat anti-mouse/anti-rabbit; Dako). Immunohistochemical analyses of histone methylation were performed on slides consecutive to staining for SMCs, leukocytes, or macrophages/macrophage-derived foam cells in order to evaluate the expression level (by analysing staining intensity) of histone methylation in individual cells within the whole carotid tissue specimens via light microscopy and a semi-quantitative scoring, ranging from (-) for no staining to (+++) for strong positive staining.

Quantification of DNA methylation in tissue samples

DNA was extracted from formalin fixed and paraffin embedded tissue specimens consecutive to the histological samples and bisulfite-converted accordingly to manufacturer's protocol (Qiagen, Hilden, Germany). DNA methylation was assessed by quantitative PCR of repetitive DNA-sequences LINE1 and SAT- α (Methylight-system) using the TaqMan Universal PCR Master Mix, (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany). Methylation-independent re-

petitive DNA-sequence ALU1 served as a reference for the input of bisulfite converted DNA (EpiTect PCR Control DNA Set, Qiagen), as established by Weisenberger et al. (25) Primers were optimised for ABI Prism 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems). Quantification was normalised to the ALU1 gene within the log-linear phase of the amplification curve obtained for each probe/primer set, using the $\Delta\Delta\text{CT}$ method.

Quantification of DNA methylation in blood

Blood sampling was performed within two days prior to surgical intervention by vein puncture. Venous blood was centrifuged at $2,000 \times g$ for 10 minutes at room temperature and stored at -70°C until analysis. DNA was isolated using QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) according to manufacturer's instructions using 200 μl of serum for each extraction procedure and bisulfite-converted, as described above. DNA methylation was assessed by quantitative PCR of repetitive DNA-sequences LINE1 and SAT- α and normalised for the methylation-independent repetitive DNA-sequence ALU1.

For DNA methylation analysis of blood cells, peripheral blood was collected prospectively from five healthy individuals and 10 patients with high-grade carotid artery stenosis ($>70\%$) using EDTA tubes (S-Monovette 7.5 ml, Sarstedt, Nümbrecht, Germany). Following centrifugation, mononuclear cells were isolated by density gradient centrifugation using histopaque (1.077 g/ml; Sigma-Aldrich; Munich, Germany) using Leucosep tubes (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany) and the corresponding manufacturer's protocol. Following overnight incubation in RPMI1640 medium (Biochrom; Berlin, Germany) supplemented with 1% penicillin/streptomycin and 10% fetal bovine serum (FBS) (Biochrom) at $37^\circ\text{C}/5\%\text{CO}_2$, lymphocytes in the supernatants and adhered monocytes were collected separately. After three washes in phosphate-buffered saline, DNA was extracted as described above, bisulfite-converted and analysed by quantitative PCR of LINE1 and SAT- α .

Quantitative Real-Time RT-PCR

For expression analyses of histone and DNA methyltransferases we selected enzymes that were among the first to be identified, as reviewed by Santos-Rosa et al. (26): hSET1A, SET7/9, MLL2 for methylation of H3K4; SUV39H1, SUV39H2, or ESET/SETDB1 for methylation of H3K9; G9a and EZH2 for methylation of H3K27; and DNMT1, DNMT3A and B, TET1 for DNA methylation. RNA was isolated from FFPE tissue sections adjacent to slides used for histological characterisation by the High Pure RNA Paraffin Kit (Roche, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions. In all cases, two sections of 10 μm thickness were used, yielding 10–20 ng/ μl of RNA per tissue sample. The maximum amount of isolated RNA (11 μl) was then reverse transcribed using the cDNA Synthesis Kit RevertAid and oligo-dT primers supplied by the manufacturer (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany). Quantitative Real-Time PCR was performed with 2 μl of cDNA in total reaction mix of 25 μl using SYBRgreen fluorescence dye (peqLab,

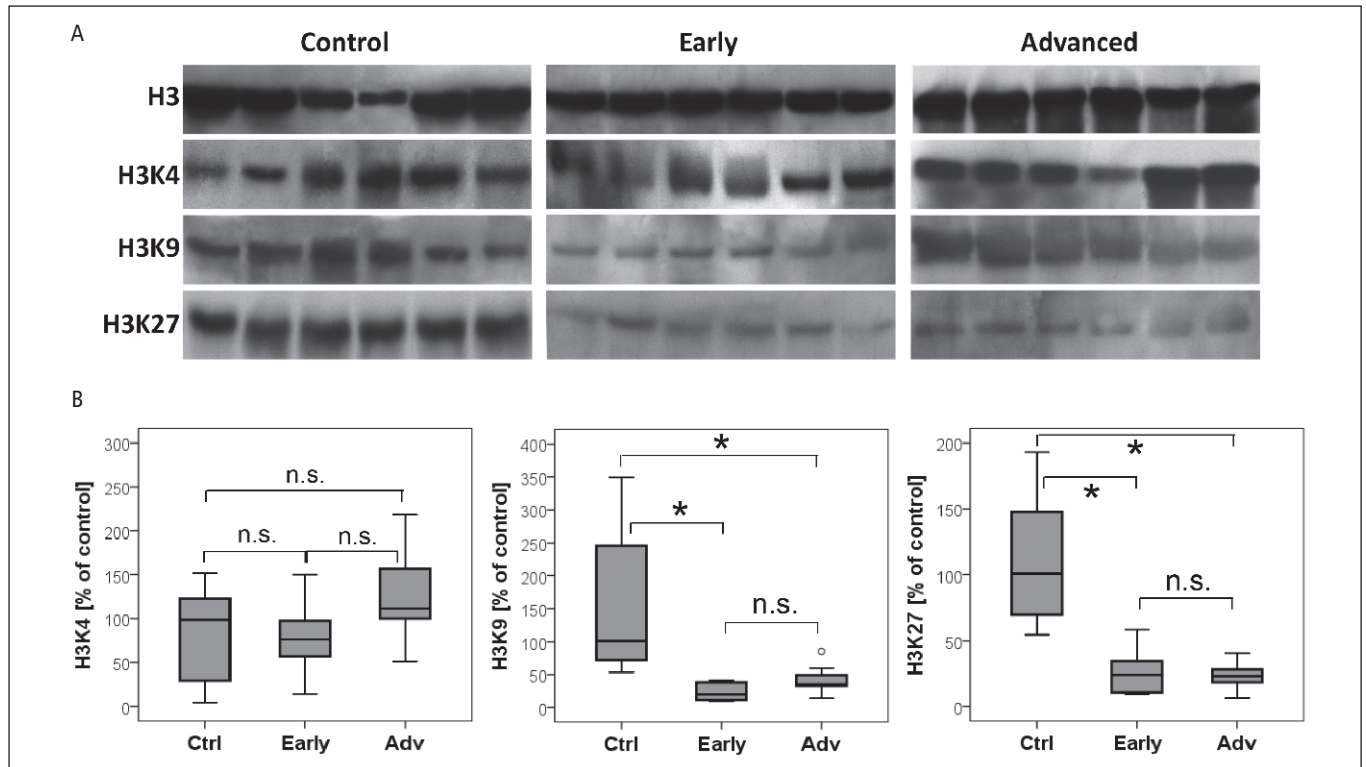


Figure 1: Methylation of H3K4, H3K9 and H3K27 in atherosclerotic lesions and healthy vessels. A) Western blot analysis of the expression of total histone H3 and methylated H3K4, H3K9 and H3K27 in control carotid arteries, and in early and advanced atherosclerotic lesions. B) Quantification

of methylated H3K4, H3K9 and H3K27 histone relative to the expression of total histone H3. Ctrl – control healthy carotid vessel (n=6), Early – early stage of atherosclerosis (n=24), Adv – advanced stage of atherosclerosis (n=24). *p<0.05, n.s. – not significant.

Erlangen, Germany) and specific primer pairs from Qiagen, QuantiTect Primer Assays: Hs_KIAA0339_1/Cat. QT00042427, Hs_MLL_2/Cat. QT00247464, Hs_SETDB1/Cat. QT00086142, Hs_SET7_1/Cat. QT00079282, Hs_SUV39H1_1/Cat. QT00091042, Hs_SET39H2_1/Cat. QT00094311, Hs_EZH1_1/Cat. QT00030275, Hs_EZH2_1/Cat. QT00054614, Hs_DNMT1_1/Cat. QT00034335, Hs_DNMT3A_1/Cat. QT00090832, Hs_DNMT3B_1/Cat. QT00032067, Hs_TET1_1/Cat. QT00037646, Hs_GAPDH_1/Cat. QT00079247) by the ABI Prism 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems). All results were normalised for the expression of GAPDH.

Statistical analysis

Results were analysed by using SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). The study groups were first compared by Levene's test to assess the equality of variances between groups. There was no homogeneity. Consequently, Kruskal–Wallis one-way analysis of variance was applied in all cases for $n > 2$. As a post-hoc tests, Mann-Whitney was used and correction for multiple testing was done using Benjamini-Hochberg procedure as a non-conservative approach that does not affect statistical power (27). Data obtained from semi-quantitative scoring of IHC staining were treated as categorical data and analysed in the same manner as continuous variables, as described above using non-parametric statistical tests.

Data are expressed using box plot diagrams showing the median and the 25th and 75th percentile or error bars. Differences with p values <0.05 were considered to be statistically significant.

Results

Differential histone methylation patterns in smooth muscle and inflammatory cells in atherosclerotic lesions

Groups of carotid plaques with early (stage I-III, n=60) and advanced atherosclerosis (stage V-VII, n=60) were collected from patients with high-grade carotid stenosis undergoing carotid endarterectomy (CEA). We first assessed methylation of histone H3 at position K4, K9, and K27 relative to the expression of total histone H3 in nuclear histone extracts from atherosclerotic carotid arteries compared to undiseased control vessels by Western blot analyses (► Figure 1). For methylated H3K4 a slight trend towards an increased abundance was observed in advanced atherosclerotic lesions compared to control arteries or early lesions, which however did not reach statistical significance (► Figure 1A). In contrast, methylated H3K9 and H3K27 showed a significant three- to four-fold reduction in early and advanced stages of atherosclerosis, compared to healthy vessels (► Figure 1B and C), while

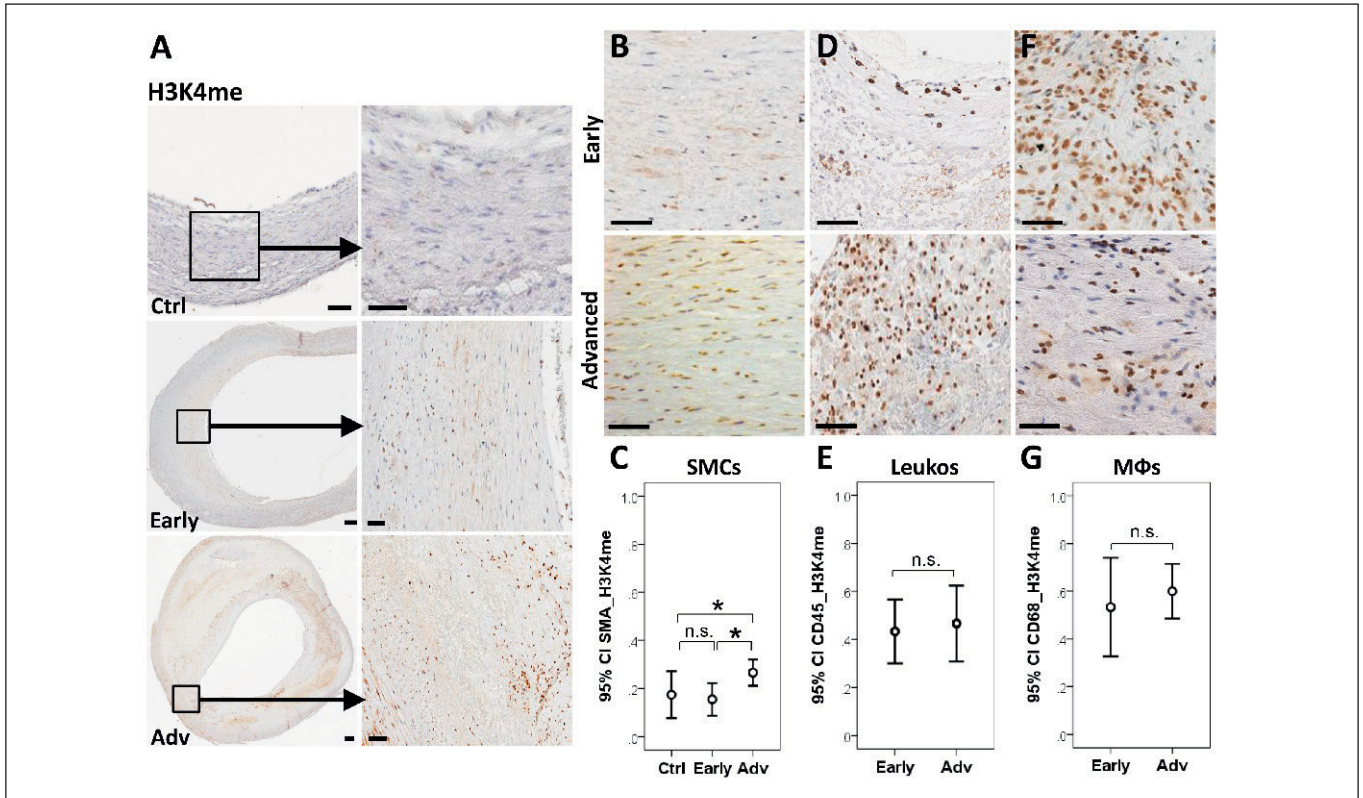


Figure 2: Methylation patterns of H3K4 in atherosclerotic lesions and healthy vessels. A) Representative images of immunohistochemistry of H3K4me in control carotid arteries, early and advanced atherosclerotic lesions (scale bars, 100 μ m). B, D, F) Representative images of the atherosclerotic shoulder region showing differences in the staining intensity of H3K4me in early and advanced stages of atherosclerosis (scale bars, 100 μ m) and C, E, G) semi-quantitative analysis of immunohistochemical staining in-

tensity of H3K4me in the whole carotid vessel wall in SMC (B, C), leukocytes (D, E) and macrophages (F, G) in control carotid arteries (n=12), early (n=60) and advanced atherosclerotic lesions (n=60). Ctrl – control healthy carotid vessel, Early – early stage of atherosclerosis, Adv – advanced stage of atherosclerosis. The overall highest staining intensity was set as 1.0. * $p < 0.05$, n.s. – not significant.

no further differences were noted between early and advanced atherosclerotic stages.

During progression of atherosclerosis, smooth muscle cells (SMCs) are being activated and inflammatory leukocytes and macrophages/macrophage-derived foam cells accumulate within the plaque. We therefore localised the methylation pattern of histone H3 at position K4, K9, and K27 by means of immunohistochemistry and semi-quantitatively scored its expression in SM-actin⁺ SMCs, CD45⁺ leukocytes, and CD68⁺ macrophages in the whole vessel by co-staining in consecutive sections at different stages of lesion formation. Control sections contained only few inflammatory cells (not shown), precluding the analysis of leukocytes and macrophages in these specimens. Methylation of histone H3 at position K4 could be localised to SMC-rich areas, but was also associated with inflammatory cells (► Figure 2). Staining intensity of H3K4 showed a significant 1.7-fold increase in SMCs in advanced compared to early stages of atherosclerosis ($p = 0.044$), whereas no differences were observed between control carotid tissue and early lesions (► Figure 2B, C). Methylation of H3K4 was unaltered in leukocytes (► Figure 2D, E) and macrophages (► Figure 2F, G) in early compared to advanced atherosclerotic

lesions. In contrast, methylation of H3 at position K9 (► Figure 3) showed a 1.9-fold reduction ($p = 0.019$) in SMCs in early lesions compared to controls (► Figure 3B, C) and further significantly decreased by factor 8.1 in advanced compared to early lesion ($p < 0.001$). Similarly, staining intensity of methylated H3K4 showed a significant 2.1-fold reduction in leukocytes ($p < 0.001$, ► Figure 3D, E) and a non-significant trend towards reduced expression in macrophages (► Figure 3F, G) in advanced vs early lesion stages. Methylation of histone H3 at position K27 (► Figure 4) showed a significant reduction in methylation in SMCs in early and advanced atherosclerotic lesions vs control tissue (factor 7.8, $p = 0.007$ and factor 3.6, $p = 0.037$, ► Figure 4B, C), and was decreased in leukocytes (factor 1.7, $p < 0.001$, ► Figure 4D, E) and macrophages (factor 1.6, $p < 0.001$, ► Figure 4F, G) in advanced compared to early disease stages. These data demonstrate cell-type specific methylation patterns in atherosclerosis, and that decreased methylation of H3K9 and H3K27 is associated with more advanced lesion stages.

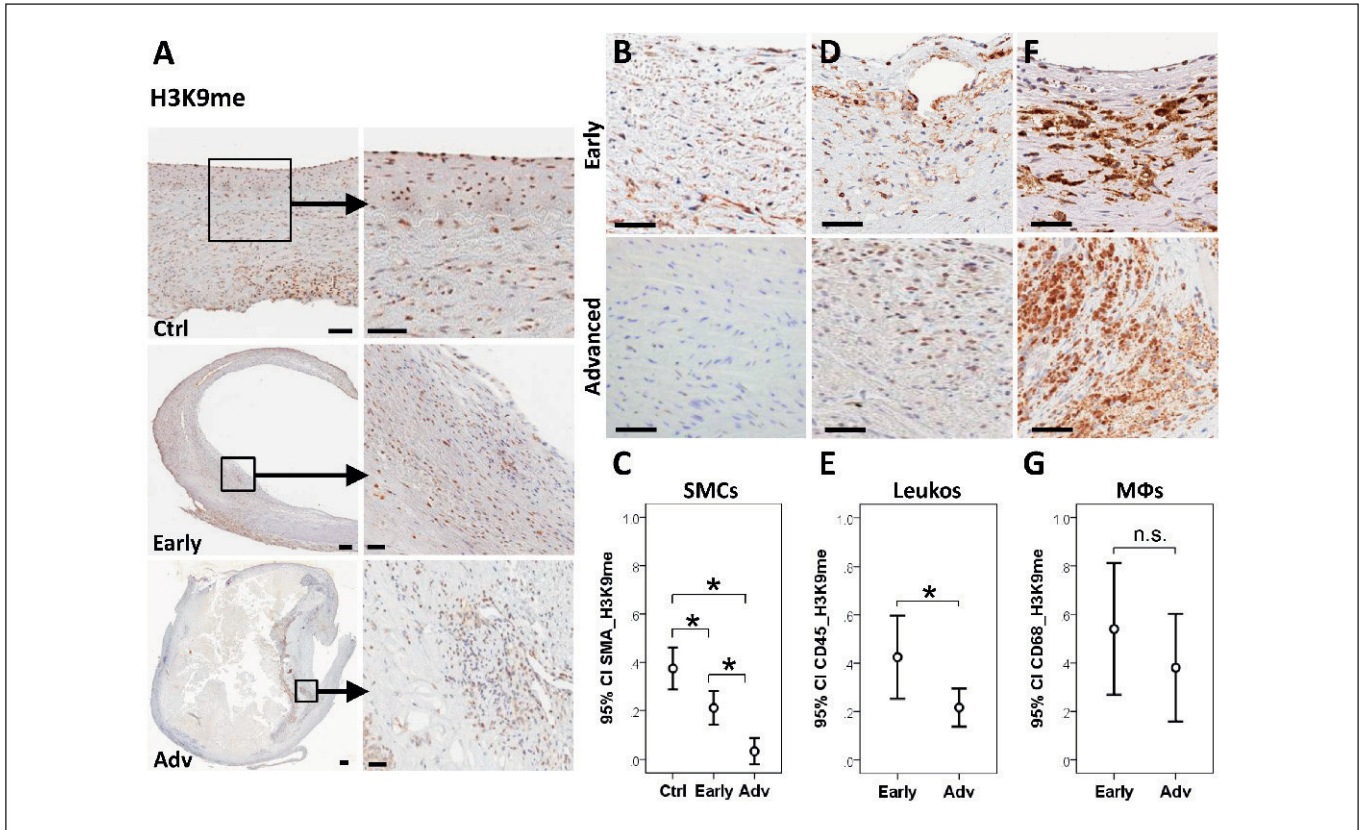


Figure 3: Methylation patterns of H3K9 in atherosclerotic lesions and healthy vessels. A) Representative images of immunohistochemistry of H3K9me in control carotid arteries, early and advanced atherosclerotic lesions (scale bars, 100 μ m). B, D, F) Representative images of the atherosclerotic shoulder region showing differences in the staining intensity of H3K9me in early and advanced stages of atherosclerosis (scale bars, 100 μ m) and C, E, G) semi-quantitative analysis of immunohistochemical staining in-

tensity of H3K9me in the whole carotid vessel wall in SMC (B, C), leukocytes (D, E) and macrophages (F, G) in control carotid arteries (n=12), early (n=60) and advanced atherosclerotic lesions (n=60). Ctrl – control healthy carotid vessel, Early – early stage of atherosclerosis, Adv – advanced stage of atherosclerosis. The overall highest staining intensity was set as 1.0. * $p < 0.05$, n.s. – not significant.

Expression of histone methyltransferases varies in atherosclerosis

To further investigate whether these changes in histone methylation in atherosclerotic lesions were associated with differences in the expression of corresponding histone methyltransferases (26), their mRNA expression was analysed in tissue consecutive to sections used for histology. For position H3K4, mRNA levels of three known methyltransferases were evaluated (hSET1A, SET7/9, MLL2). No expression was found for hSET1A and SET7/9 (data not shown). Expression of methyltransferase MLL2 showed a broad variation in control tissue. Comparing medians, a significant reduction in MLL2 expression was detected between control tissue and early stages of atherosclerosis, and an increase was observed between early and advanced stages of atherosclerosis ($p < 0.001$, \blacktriangleright Figure 5A). With regards to methyltransferases for position H3K9 and H3K27, a significant decrease in expression in G9a was observed between control groups and early stages of atherosclerosis (factor 2.5, $p = 0.005$), and a significant increase between early and advanced atherosclerotic lesions (factor 3.2,

$p = 0.002$, \blacktriangleright Figure 5B). No expression was observed for SUV39H1, SUV39H2, or ESET/SETDB1 (data not shown). Furthermore, no expression of the methyltransferase EZH2 for position H3K27 was detected (data not shown).

In order to achieve more specific results with regards to the expression of histone methyltransferases in individual cell types within carotid atherosclerotic lesions, we performed micro-dissection and analysed their mRNA expression in SMA⁺ SMCs, CD45⁺ leukocytes and CD68⁺ macrophages (\blacktriangleright Figure 6A, B). For MLL2, an up to two-fold increase in expression was found in SMCs in advanced stages of atherosclerosis in comparison to early lesions or control arteries ($p < 0.05$, \blacktriangleright Figure 6A). The expression of MLL2 was furthermore increased in leukocytes in advanced atherosclerotic plaques compared to the undetectable expression in early lesions (\blacktriangleright Figure 6A). In macrophages, no differences in expression of MLL2 were observed between early and advanced atherosclerotic lesions (\blacktriangleright Figure 6A). With regards to G9a, highest expression was detected in SMCs in healthy control artery, whereas only very low levels and no expression was found in early and advanced atherosclerotic lesions, respectively (\blacktriangleright Figure 6B).

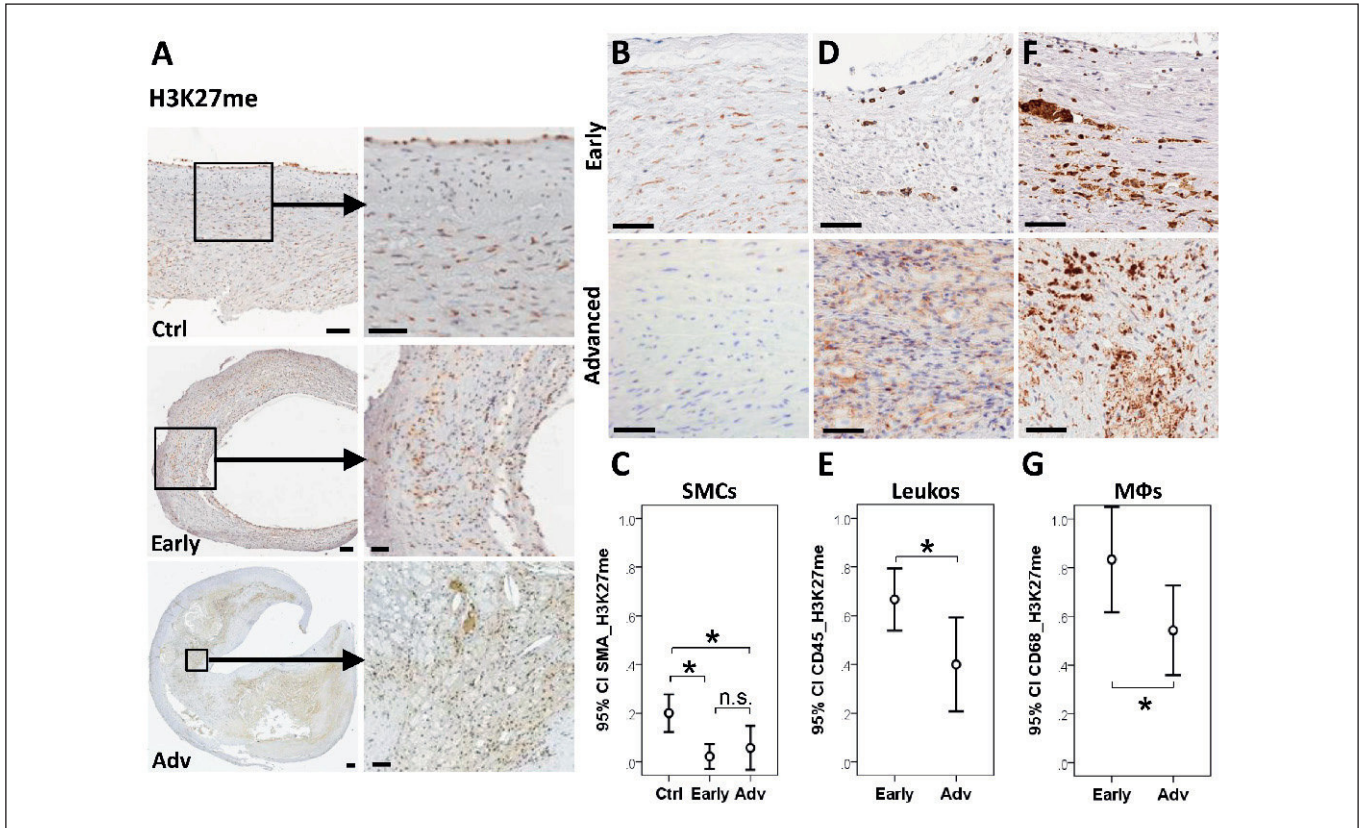


Figure 4: Methylation patterns of H3K27 in atherosclerotic lesions and healthy vessels. A) Representative images of immunohistochemistry of H3K27me in control carotid arteries, early and advanced atherosclerotic lesions (scale bars, 100 μ m). B, D, F) Representative images of the atherosclerotic shoulder region showing differences in the staining intensity of H3K27me in early and advanced stages of atherosclerosis (scale bars, 100 μ m) and C, E, G) semi-quantitative analysis of immunohistochemical staining

intensity of H3K27me in the whole carotid vessel wall in SMC (B, C), leukocytes (D, E) and macrophages (F, G) in control carotid arteries (n=12), early (n=60) and advanced atherosclerotic lesions (n=60). Ctrl – control healthy carotid vessel, Early – early stage of atherosclerosis, Adv – advanced stage of atherosclerosis. The overall highest staining intensity was set as 1.0. * $p < 0.05$, n.s. – not significant.

Expression of G9a in leukocytes was only detectable in advanced atherosclerotic lesions (► Figure 6B). Interestingly, in macrophages the highest expression of G9a was observed in early stages of atherosclerosis, and a significantly lower expression was observed in advanced lesions (► Figure 6B).

DNA methylation decreases with progression of atherosclerosis

Furthermore, we assessed the DNA methylation status in atherosclerosis. In order to analyse DNA methylation at different stages of atherosclerosis, quantitative PCRs were performed to detect hypomethylation of repetitive sequences LINE1 and SAT- α in control vessels, as well as in early and advanced atherosclerotic plaques of carotid arteries (► Figure 7). These DNA sequences capture 11–17% of whole genomic DNA and are scattered throughout the entire genome. Changes in these two interspersed elements may thus serve as a measure for global DNA methylation. Compared with healthy vessels, DNA methylation of LINE1 was diminished to 62.3% in early atherosclerotic lesions, and further decreased to

32.4% in advanced stages of atherosclerosis ($p=0.031$ and $p=0.014$, respectively). Similarly, a decrease in methylation of the repetitive sequence SAT- α to 73.2% ($p=0.076$) and 39.3% ($p=0.023$) was observed in early and advanced atherosclerotic lesions, respectively. These data demonstrate that DNA methylation clearly decreases with the progression of atherosclerosis.

Expression of DNMT1 decreases, whereas TET1 increases in atherosclerosis

DNA methylation is conducted by enzymes that are different to histone methyltransferases. As these may be altered during disease progression, we analysed the expression of DNA methyltransferases DNMT1, 3A, and 3B, as well the expression of DNA-demethylase TET1 in healthy vessels and carotid arteries at different stages of atherosclerosis. Compared to control carotid artery tissue, transcripts of DNMT1 showed a significant decrease in expression to 7.7% (range 0–108%) and 2.5% (range 0–26%) in early and advanced atherosclerotic lesions when compared to the expression in healthy vessel, respectively ($p=0.022$ and $p=0.047$,

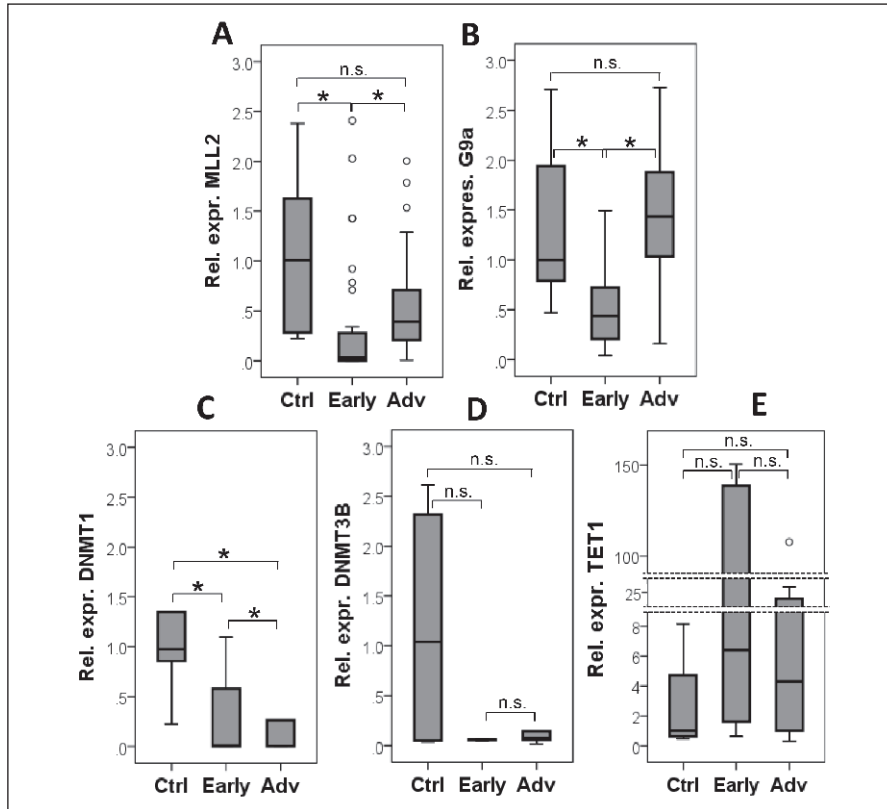


Figure 5: Expression of histone and DNA methyltransferases in atherosclerotic lesions at mRNA level. A, B) histone methyltransferases; C, D, E) DNA methyltransferases. Early – early stage (n=60), Adv – advanced stage (n=60) of atherosclerosis, Ctrl – control vessel (n=12). Quantification was performed by SYBRGreen-based RT-PCR and normalised to the expression of GAPDH. Expression of the individual methyltransferases in healthy tissue was set as 1. The changes in Early and Advanced groups demonstrate ...-fold increase or decrease related to control. * $p < 0.05$.

► Figure 5C), while no significant differences could be detected between early and advanced stages of atherosclerosis ($p=0.810$). The expression of DNMT3A was detected neither in control tissue nor in atherosclerotic lesions (data not shown). DNMT3B mRNA levels showed a trend towards decreased expression down to 5.6% (range 0–11%, $p=0.686$) in early and to 7.1% (range 0–22%, $p=0.556$) in advanced stages of atherosclerosis without reaching statistical significance when compared to healthy control tissue (► Figure 5D). In contrast to DNMTs, TET1 showed an increased expression in early and advanced stages of atherosclerosis (6.8- and 4.5-fold). These changes however did not reach statistical significance (► Figure 5E). Notably, the expression of DNMT3B and TET1 was markedly lower than that of DNMT1.

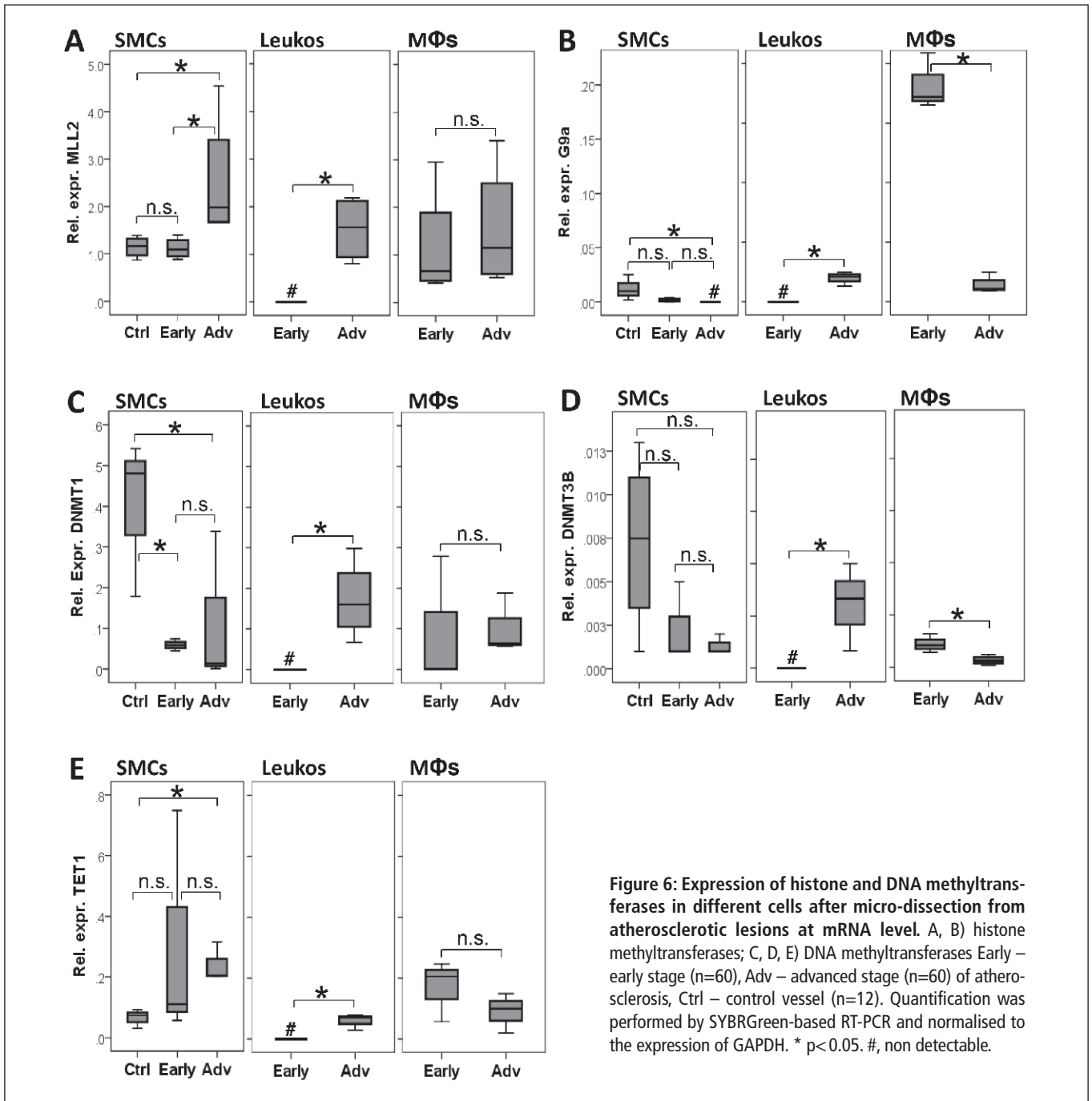
We furthermore performed micro-dissection and analysed the expression of DNMT1, DNMT3B, and TET1 specifically in SMCs, leukocytes and macrophages (► Figure 6C-E). The mRNA expression of DNMT1 in SMCs resembled that of whole tissue with highest expression in control arteries, which decreased in early and advanced stages of atherosclerosis (► Figure 6C). The expression of DNMT1 in leukocytes and macrophages was mainly detected in advanced atherosclerotic plaques (► Figure 6C). Similar results were found for DNMT3B, although differences did not reach statistical significance (► Figure 6D). In leukocytes, DNMT3B expression could only be detected in advanced stages of atherosclerosis. For macrophages, an expression was detected in early and advanced stages of atherosclerosis, although expression was lower in advanced compared to early plaques (► Figure 6D).

With regard to the mRNA expression of TET1, a significant increase was observed in SMCs in advanced stages of atherosclerosis compared to control arteries (► Figure 6E). In leukocytes, TET1 expression could only be detected in advanced stages. In macrophages, an increased expression was detected in early and advanced stages of atherosclerosis without any significant differences between the groups (► Figure 6E).

DNA methylation decreases in serum of patients with high-grade carotid stenosis

As previously described, cell-free DNA is present in blood and its methylation state can be influenced by accompanying diseases (28, 29). Observing the decrease in DNA methylation of LINE-1 and SAT- α in atherosclerosis, we also wanted to assess, whether this might be paralleled by changes in the methylation of cell-free DNA in serum blood samples of patients with high-grade carotid stenosis in comparison to healthy volunteers. Interestingly, for both repetitive DNA sequences LINE1 and SAT- α , a significant reduction in DNA methylation was found in serum of carotid patients compared to healthy individuals. The state of DNA methylation was 36.9% for LINE1 and 67.5% for SAT- α , compared to healthy volunteers ($p < 0.001$ and $p = 0.005$, respectively, ► Figure 7B).

Furthermore, we assessed the DNA methylation in monocytes and lymphocytes in blood of healthy individuals and patients with advanced carotid stenosis, collected prospectively. In contrast to serum, however, no differences were observed in the methylation



of DNA of LINE1 ($p=0.282$ for lymphocytes, $p=0.482$ for monocytes) or SAT- α , which showed a trend towards increased methylation in patients vs controls without reaching statistical significance ($p=0.085$ for lymphocytes, $p=0.235$ for monocytes).

Discussion

The results of our study indicate that epigenetic changes can be found in atherosclerotic lesions, as shown by significant alterations

in histone and DNA methylation at different stages of atherosclerosis. Most importantly, significant differences were observed for DNA methylation between controls, early and advanced stages of atherosclerosis in carotid artery tissue and in serum between healthy individuals and patients with high-grade carotid stenosis. Histone methylation but foremost the extent of methylated repetitive sequences LINE1 and SAT α might thus serve as a potential epigenetic marker of plaque progression.

Post-transcriptional modifications of histones and in particular their methylation status are closely implicated in the regulation of

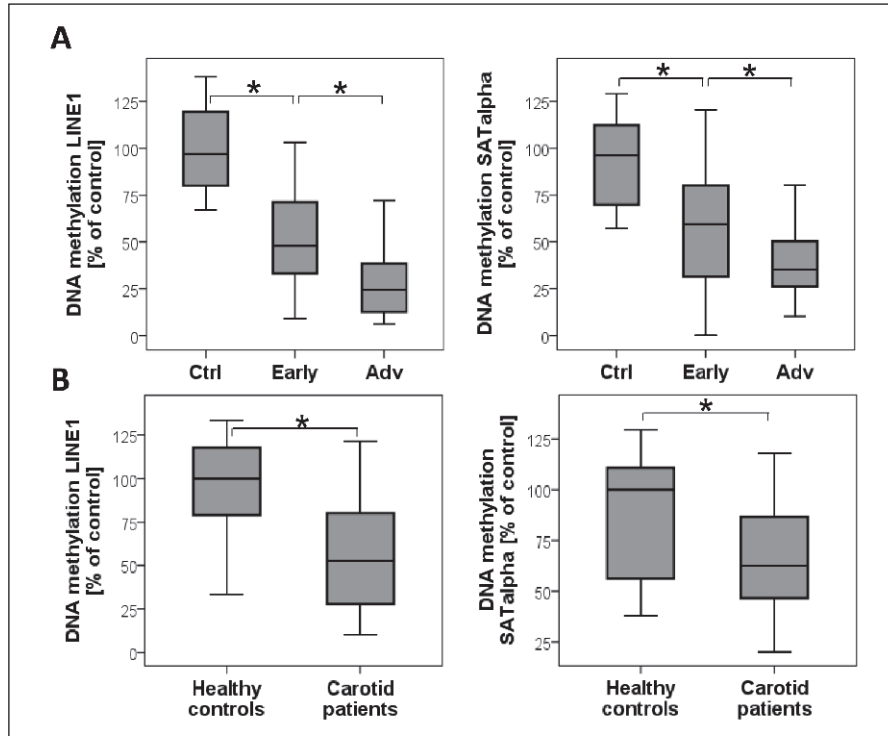


Figure 7: DNA methylation in atherosclerosis lesions, healthy vessels and in serum of patients with high-grade carotid artery stenosis with (> 70 %) compared to healthy individuals. A) Carotid tissue samples; B) Serum samples. Bisulfite-converted DNA was used to determine methylation of repetitive sequences LINE1 and SAT- α in control carotid arteries (n=12), early (n=60) and advanced atherosclerotic lesions (n=60). Quantification was normalised to ALU1 within the log-linear phase of the amplification curve using the $\Delta\Delta$ CT method. The extent of DNA methylation of control vessels was set as 100%. *p<0.05.

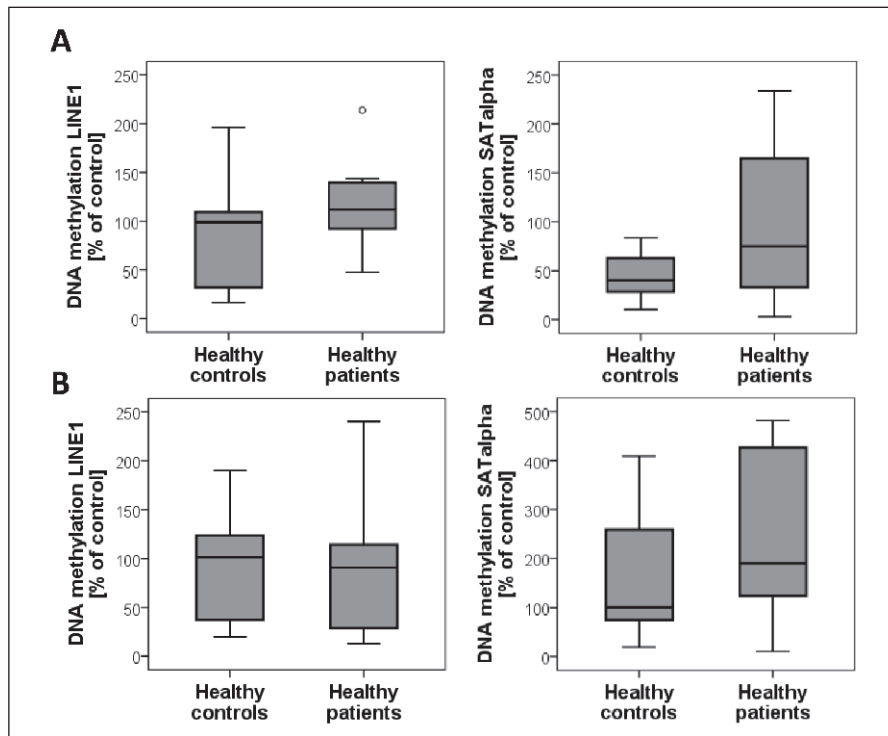


Figure 8: DNA methylation in peripheral blood cells of patients with high-grade carotid artery stenosis (> 70 %) compared to healthy individuals. A) Lymphocytes; B) Monocytes. DNA methylation of repetitive sequences LINE1 and SAT- α in blood cells from healthy individuals (n=5) and patients with carotid artery stenosis (n=10). Quantification was normalised to ALU1 within the log-linear phase of the amplification curve using the $\Delta\Delta$ CT method. The extent of DNA methylation of healthy individuals was set as 100%. No significant differences were observed between groups.

gene expression (1, 7, 30). The methylation of histones is able to either activate or inhibit gene transcription (4, 30, 31). Especially di-methylation was described to be necessary and sufficient to perform and maintain chromatin remodeling (32, 33). In addition, di-methylation seems to be the most widely distributed (34). Di- and

tri-methylation of H3K4 is frequently enriched at actively transcribed genes. However, while di-methyl modification appears to be distributed across active genes, tri-methylation is more specific and localised at the 5' end of these genes (32). Furthermore, di-

methylation of H3K9 and H3K27 seems to be sufficient to silence most gene promoters (33).

The results of the current study show significant changes in the methylation status of H3K4 and H3K9 in atherosclerosis. In carotid atherosclerotic lesions, methylation of H3K4 was increased, but that of H3K9 reduced, in particular in SMCs, and as for H3K9 also in leukocytes. Both, an increased methylation of H3K4 as well as a reduction in methylation of H3K9 facilitate gene expression (3, 14). SMCs are important components of the vascular wall, responsible for maintaining its stability and proper function (35). Upon various stimuli, SMCs change their phenotype from contractile to synthetic, leading to an increased production of collagen and proteoglycans. SMCs within the fibrous cap of atherosclerotic plaques may either play critical or beneficial roles for lesion stability, depending on their phenotypic state (31, 36). In addition, SMCs often undergo apoptosis and/or activate expression of various matrix metalloproteinases and/or inflammatory mediators, thus promoting plaque rupture and thrombosis (31). Manabe et al. provided evidence that the key step in controlling gene expression in SMCs are changes in histone acetylation and methylation, especially on H3K4 (32, 37). Our data suggest that hypermethylation of H3K4 and hypomethylation of H3K9 could control SMC activation in atherosclerosis. We in addition observed a significant reduction in methylated H3K27 especially in inflammatory cells. In line with findings by De Santa et al. (38), who revealed gene silencing in macrophages to depend on histone H3K27 methylation, our data indicate a potential role of H3K27 not only in macrophages but also inflammatory leukocytes in atherosclerosis.

Histone methylation is regulated by histone methyltransferases that are highly specific for individual lysine residues within the N-terminal histone tail. Interestingly, we could detect only two of the nine transferases analysed in our study (26). For H3K4, only the methyltransferase MLL2 was detected. In addition, methylation of H3 at the position K4 was increased in advanced lesions compared to early stages of atherosclerosis, implying that MLL2 may contribute to maintaining or increasing H3K4 methylation during lesion progression (26, 39). We did not, however, observe any significant differences in the expression of MLL2 between control carotid vessels and atherosclerotic tissue samples. A possible explanation for this apparent discrepancy could lie in the abundance and phenotype of SMCs, given the significant changes in H3K4 methylation in SMCs in advanced atherosclerosis. While in healthy vessels SMCs are the predominant cell type and of a contractile phenotype, the proportion of SMCs among all cells is reduced in atherosclerotic lesions that are infiltrated by inflammatory cells, and SMCs change to the synthetic phenotype. The exact role of H3K4 methylation in SMCs in atherosclerosis remains to be addressed in future studies.

Regarding methyltransferases specific for H3K9 and H3K27, only G9a was detected. Compared to healthy vessels, we observed a reduction in G9a expression in early stages of atherosclerosis, whereas G9a expression was again increased in advanced versus early atherosclerotic lesions. Methylation at lysine K9 and/or K27 leads to gene silencing. Given its overall reduction in atherosclerosis in SMCs and leukocytes, this increased expression in G9a

in advanced lesions seems contradictory. However, the expression of certain methyltransferases does not necessarily have to correlate with histone methylation, as there are also histone demethylases, which we did not analyse in our study (22).

The role of DNA methylation and DNMTs has already been studied in cancer, organ and body development (15, 40). In contrast, their expression in atherosclerosis had not been addressed previously. We here demonstrate that the expression of DNMT1 significantly decreases in advanced stages of atherosclerosis. These findings may be in line with the study of Hiltunen et al. who observed a 9% decrease in methyl-deoxycytosine content reduction in DNA methylation in SMCs from rabbit atherosclerotic lesions, which well corresponds with our results demonstrating a two- to four-fold decrease in DNA methylation in human carotid atherosclerosis (16). On the other hand, these authors observed an only about 10% reduction of GpC content in human atherosclerotic lesions. However, the atherosclerotic lesion stage has not been analysed; moreover, human arterial samples were obtained from autopsy (6–10 hours after death) or amputations so that post-mortem changes in tissues samples cannot be excluded. In contrast, we have compared control arteries, and early and advanced stages of atherosclerosis and observed a significant reduction in DNA methylation in particular in advanced atherosclerotic lesions. As DNMT1 methylates newly replicated DNA and functions to maintain DNA methylation, a decrease in its expression may be one of the principal causes for the reduction in global DNA methylation found in carotid atherosclerosis, indicating its potential contribution to the process of atherosclerosis.

De novo methylation of DNA is provided by DNMT3A and 3B. The expression of DNMT3A, however, was not detected in our samples. DNMT3B expression levels were overall very low, but simi-

What is known about this topic?

- Epigenetics is a powerful tool to regulate gene expression.
- Epigenetics, especially histone and DNA methylation, may alter in various diseases.
- Recently, epigenetics was proposed as a possible mechanism to control gene expression in cardiovascular disease.
- Very little is known about epigenetic changes in human atherosclerotic lesions.

What does this paper add?

- Our results demonstrate for the first time significant changes in DNA and histone methylation in carotid atherosclerotic lesions compared to healthy vessels.
- Significant differences were observed between expression of histone and DNA methyltransferases at different stages of atherosclerosis.
- Significant reduction of DNA methylation in the repetitive sequences LINE1 and SAT α was observed in cell-free blood of patients with advanced carotid stenosis compared to healthy individuals.

lar to that of DNMT1, decreased in atherosclerotic lesions. Spin et al. observed a significant downregulation of DNMT3A and 3B expression in vascular smooth muscle cells during de-differentiation (41), a process which also occurs in atherosclerosis. Furthermore, an increased expression of the methylcytosine dioxygenase TET1 was observed in early atherosclerosis, an enzyme involved in the demethylation of DNA (42–44). Thus, TET1 may contribute to the DNA-hypomethylation in atherosclerosis.

Importantly, a reduction in DNA methylation, as indicated by methylation of the repetitive sequences LINE1 and SAT α , was also observed in serum of patients with high-grade carotid artery stenosis compared to healthy volunteers, indicating its potential applicability as a marker for the progression of atherosclerosis. Interestingly, analysis of peripheral blood cells did not show any significant differences in DNA methylation of LINE1 and SAT α between study groups. A non-significant trend towards increased methylation of SAT- α in patients vs controls would be supportive of findings by Stenvinkel et al., who found a global DNA hypermethylation in peripheral blood cells of patients with cardiovascular disease and chronic kidney disease (CKD) (45). These discrepancies in the methylation patterns between cell-free blood serum and peripheral mononuclear cells remain to be addressed in further studies, but may indicate that hypomethylated DNA in serum originates from atherosclerotic plaques rather than blood cells, and may be in line with a study of cancer patients, in which hypomethylated DNA in cell-free serum was described to mainly derive from malignant cells and not from blood cells (46). The origin and mechanism of the release of DNA into blood are still not fully understood, but it is believed that apoptotic and necrotic cells are the main source of cell-free DNA in blood (47). Advanced atherosclerotic plaques contain a plethora of apoptotic SMCs and necrotic macrophage-derived foam cells (48), which may release DNA into blood. In addition, DNA may also be released from circulating inflammatory cells (49). The DNA methylation status in cell-free DNA in serum may thus correlate with DNA methylation in cells within atherosclerotic lesions.

Recent findings provided evidence that DNA and histone methylation are closely linked to each other (5, 7, 14, 15, 50). For example, Tamaru et al. proposed a model, in which a repressor complex containing G9a subsequently recruits DNMT3A and 3B, so that methylation of H3K9 acts as an epigenetic marker of DNA methylation (50). The detection of G9a together with the reduction of methylation of H3K9 and H3K27 and decreased expression of DNMT3B in our study may confirm a possible interaction of DNA and histone methylation in atherosclerosis. Furthermore, methylation of H3K4 has been suggested to protect gene promoters from *de novo* DNA methylation (7). Methylated H3K4 may thus inhibit methylation by DNMT3B in atherosclerosis. Further crosstalk between DNA and histone methylation was demonstrated by DNMT1 methylation being regulated by histone demethylase LSD1 and histone methylase SET7/9 (51), or methyl-CpG binding proteins to recruit complexes containing various histone deacetylases and methyltransferases (7).

Study limitations

We performed our PCR analysis from formalin-fixed in paraffin-embedded-tissue samples in order to be able to directly correlate the expression of methyltransferases to plaque morphology. This approach, however, has the disadvantage that the RNA yield is relatively low. Furthermore, we did not analyse all of the known histone methyltransferases for H3K4, H3K9, and H3K27, which may be also expressed in atherosclerotic lesions and play a relevant role in disease progression. Control carotid arteries used in our study were obtained from the Department of Trauma Surgery and comprised all three vessel layers, i.e. the intima, media and adventitia. In contrast, atherosclerotic tissue specimen obtained after endarterectomy consisted mainly of the diseased intima. Furthermore, control carotid arteries from healthy individuals were extremely difficult to obtain, so that we were restricted to work with the tissue material available and could not compare tissue from age-matched study groups, which may constitute another study limitation. In addition, it is well known that healthy control carotid arteries and atherosclerotic lesions differ in cellular composition. These differences may have in addition biased our data. Although the MethyLight assay is a reliable and simple method to evaluate DNA methylation throughout the entire DNA by analysing repetitive sequences in LINE1 and SAT α , it is not gene specific. Additional methods such as pyrosequencing or microarray-based genome-wide analyses will have to be performed to shed further light onto gene-specific DNA methylation patterns in atherosclerosis in the future.

In summary, our results demonstrate for the first time significant differences between the expression of histone and DNA methyltransferases, histone methylation and DNA hypomethylation at different stages of atherosclerosis in carotid arteries. Epigenetic changes may thus serve as potential indicators of plaque progression. However, further studies are clearly required to evaluate the relevance of these epigenetic alternations for identification of patients with e.g. vulnerable plaques. The analysis of epigenetic changes in specific genes, such as matrix metalloproteases, may furthermore refine our understanding of these mechanisms in atherosclerosis and aid in the development of novel biomarkers or therapeutic approaches in cardiovascular medicine.

Conflicts of Interest

None declared.

References

1. Nimura K, Ura K, Kaneda Y. Histone methyltransferases: regulation of transcription and contribution to human disease. *J Mol Med* 2010; 88: 1213–1220.
2. Wu SC, Zhang Y. Active DNA demethylation: many roads lead to Rome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11: 607–620.
3. Campos EI, Reinberg D. Histones: annotating chromatin. *Annu Rev Genet* 2009; 43: 559–599.
4. Szyf M. Epigenetics, DNA methylation, and chromatin modifying drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2009; 49: 243–263.
5. Szyf M. Targeting DNA methylation in cancer. *Bull Cancer* 2006; 93: 961–972.

6. Cedar H, Bergman Y. Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat Rev Genet* 2009; 10: 295–304.
7. Kondo Y. Epigenetic cross-talk between DNA methylation and histone modifications in human cancers. *Yonsei Med J* 2009; 50: 455–463.
8. Ivanova T, Vinokurova S, Petrenko A, et al. Frequent hypermethylation of 5' flanking region of TIMP-2 gene in cervical cancer. *Int J Cancer* 2004; 108: 882–886.
9. Bumber Y, Issa JP. Epigenetics in cancer: what's the future? *Oncology* 2011; 25: 220–226.
10. Shima K, Morikawa T, Baba Y, et al. MGMT promoter methylation, loss of expression and prognosis in 855 colorectal cancers. *Cancer Causes Control* 2011; 22: 301–309.
11. Pavicic W, Joensuu EI, Nieminen T, Peltomäki P. LINE-1 hypomethylation in familial and sporadic cancer. *J Mol Med* 2012; 90: 827–835.
12. Dong C, Yoon W, Goldschmidt-Clermont PJ. DNA Methylation and Atherosclerosis. *J Nutr* 2002; 132: 2406S–2409S.
13. Castillo-Díaz SA, Garay-Sevilla ME, Hernández-González MA, et al. Extensive demethylation of normally hypermethylated CpG islands occurs in human atherosclerotic arteries. *Int J Mol Med* 2010; 26: 691–700.
14. Turunen MP, Ylä-Herttuala S. Epigenetic regulation of key vascular genes and growth factors. *Cardiovasc Res* 2011; 90: 441–446.
15. Ordovás JM, Smith CE. Epigenetics and cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol* 2010; 7: 510–519.
16. Hiltunen MO, Turunen MP, Häkkinen TP, et al. DNA hypomethylation and methyltransferase expression in atherosclerotic lesions. *Vasc Med* 2002; 7: b5–11.
17. Baccarelli A, Tarantini L, Wright RO, et al. Repetitive element DNA methylation and circulating endothelial and inflammation markers in the VA normative aging study. *Epigenetics* 2010; 5: 222–228.
18. Choi SH, Heo K, Byun HM, et al. Identification of preferential target sites for human DNA methyltransferases. *Nucleic Acids Res* 2011; 39: 104–118.
19. Timaran CH, McKinsey JF, Schneider PA, et al. Reporting standards for carotid interventions from the Society for Vascular Surgery. *J Vasc Surg* 2011; 53: 1679–1695.
20. Sary HC, Chandler AB, Glagov S, et al. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. *Circulation* 1994; 89: 2462–2478.
21. Sary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. *Circulation* 1995; 92: 1355–1374.
22. Reeps C, Pelisek J, Seidl S, et al. Inflammatory infiltrates and neovessels are relevant sources of MMPs in abdominal aortic aneurysm wall. *Pathobiology* 2009; 76: 243–252.
23. Pelisek J, Well G, Reeps C, et al. Neovascularization and angiogenic factors in advanced human carotid artery stenosis. *Circ J* 2012; 76: 1274–1282.
24. Lipp C, Lohoefer F, Reeps C, et al. Expression of a disintegrin and metalloprotease in human abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Res* 2012; 49: 198–206.
25. Weisenberger DJ, Campan M, Long TI, et al. Analysis of repetitive element DNA methylation by MethyLight. *Nucleic acids Res* 2008; 33: 823–836.
26. Santos-Rosa H, Caldas C. Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer. *Eur J Cancer* 2005; 41: 2381–2402.
27. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J Royal Stat Soc* 1995; 57: 298–300.
28. Begum S, Brait M, Dasgupta S, Ostrow KL, Zahurak M, Carvalho AL, Califano JA, Goodman SN, Westra WH, Hoque MO, et al. An epigenetic marker panel for detection of lung cancer using cell-free serum DNA. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 4494–4503.
29. de Martino M, Klatt T, Haitel A, et al. Serum cell-free DNA in renal cell carcinoma: a diagnostic and prognostic marker. *Cancer* 2012; 118: 82–90.
30. Greer EL, Shi Y. Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nat Rev Genet* 2012; 13: 343–357.
31. Alexander MR, Owens GK. Epigenetic control of smooth muscle cell differentiation and phenotypic switching in vascular development and disease. *Annu Rev Physiol* 2012; 74: 13–40.
32. Martin CI, Zhang Y. The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6: 838–849.
33. Rose CM, van den Driesche S, Meehan RR, et al. Epigenetic reprogramming: preparing the epigenome for the next generation. *Biochem Soc Trans* 2013; 41: 809–814.
34. Bessler JB, Andersen EC, Villeneuve AM. Differential localization and independent acquisition of the H3K9me2 and H3K9me3 chromatin modifications in the *Caenorhabditis elegans* adult germ line. *PLoS Genet* 2010; 6: e1000830.
35. Lacolley P, Regnault V, Nicoletti A, Li Z, et al. The vascular smooth muscle cell in arterial pathology: a cell that can take on multiple roles. *Cardiovasc Res* 2012; 95: 194–204.
36. Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res* 2002; 90: 251–262.
37. Manabe I, Owens GK. Recruitment of serum response factor and hyperacetylation of histones at smooth muscle-specific regulatory regions during differentiation of a novel P19-derived in vitro smooth muscle differentiation system. *Circ Res* 2001; 88: 1127–1134.
38. De Santa F, Totaro MG, Prosperini E, et al. The histone H3 lysine-27 demethylase Jmjd3 links inflammation to inhibition of polycomb-mediated gene silencing. *Cell* 2007; 130: 1083–1094.
39. Ruthenburg AJ, Allis CD, Wysocka J. Methylation of lysine 4 on histone H3: intricacy of writing and reading a single epigenetic mark. *Mol Cell* 2007; 25: 15–30.
40. Andreu-Vieyra CV, Chen R, Agno JE, et al. MLL2 is required in oocytes for bulk histone 3 lysine 4 trimethylation and transcriptional silencing. *PLoS Biol* 2010; 8: e1000453.
41. Spin JM, Quertermous T, Tsao PS. Chromatin remodeling pathways in smooth muscle cell differentiation, and evidence for an integral role for p300. *PLoS One* 2010; 5: e14301.
42. Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* 2009; 324: 930–935.
43. Wu H, Zhang Y. Mechanisms and functions of Tet protein-mediated 5-methylcytosine oxidation. *Genes Dev* 2011; 25: 2436–2452.
44. Kriaucionis S, Heintz N. The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. *Science* 2009; 324: 929–930.
45. Stenvinkel P, Karimi M, Johansson S, et al. Impact of inflammation on epigenetic DNA methylation – a novel risk factor for cardiovascular disease? *J Intern Med* 2007; 261: 488–499.
46. Qi J, Qian C, Shi W, et al. Alu-based cell-free DNA: a potential complementary biomarker for diagnosis of colorectal cancer. *Clin Biochem* 2013; 46: 64–69.
47. Yu J, Gu G, Ju S. Recent advances in clinical applications of circulating cell-free DNA integrity. *Lab Med* 2014; 45: 6–11.
48. Martinet W, Schrijvers DM, De Meyer GR. Necrotic cell death in atherosclerosis. *Basic Res Cardiol* 2011; 106: 749–760.
49. Liuzzo G, Giubilato G, Pinnelli M. T cells and cytokines in atherogenesis. *Lupus* 2005; 14: 732–735.
50. Tamaru H, Selker EU. A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nature* 2001; 414: 277–283.
51. Wang J, Hevi S, Kurash JK, et al. The lysine demethylase LSD1 (KDM1) is required for maintenance of global DNA methylation. *Nat Genet* 2009; 41: 125–129.