

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und
Pneumologie der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin
Berlin

DISSERTATION

**Bedeutung epigenetischer Vorgänge für die oxidierte LDL-
induzierte Inflammation in humanen Endothelzellen**

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Fabian Paul Martin Julian Johannes Riediger
aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. St. Hippenstiel
2. Prof. Dr. med. W. Haverkamp
3. Prof. Dr. J. Lohmeyer

Datum der Promotion: 18.09.2009

“Practising the Art while Mastering the Science”

Bernard Lown

Meinen Eltern

Zusammenfassung

Kardiovaskuläre Erkrankungen, voransteht die Atherosklerose, sind nach wie vor in den westlichen Industriestaaten die häufigste Todesursache. Es gilt als bewiesen, dass die Atherosklerose eine chronisch entzündliche Erkrankung darstellt.

Das Endothel bildet eine Barriere zwischen Blut und der Gefäßintima. Seine Schädigung ist ein initiales Ereignis in der Entstehung atherosklerotischer Läsionen.

Oxydierte Lipoproteine (oxLDL) sind an der Pathogenese der Atherosklerose wesentlich beteiligt. Sie verursachen eine inflammatorische Aktivierung des Endothels und stehen in engem Zusammenhang mit chronisch-vaskulärer Schädigung und koronarer Herzerkrankung. OxLDL induziert die Freisetzung von pro-entzündlichen Zytokinen aus dem Endothel, fördert damit die Einwanderung von inflammatorischen Zellen und führt letztlich zur Entzündung der Gefäßwand mit konsekutiver Atherosklerose.

Histonmodifikationen tragen zur Regulation der transkriptionellen Aktivität von Genen bei. Sie subsumieren spezielle chemische Änderungen an DNA stützenden Proteinen. Welchen Stellenwert Histonmodifikationen für die Atherogenese besitzen, ist nahezu unbekannt. Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung von Histonmodifikationen für die oxLDL-verursachte inflammatorische Genexpression zu untersuchen und den Einfluss von Statinen auf diese Modifikationen zu analysieren.

OxLDL aktivierte die Sekretion der Zytokine Interleukin 8 (IL-8) und Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1), welche für den entzündlichen atherosklerotischen Prozess von großer Bedeutung sind, aus venösen und aortalen Endothelzellen. Diese Sekretion wurde durch den Histon-Deacetylaseinhibitor Trichostatin A verstärkt, während der Cholesterinsenker Simvastatin diese reduzierte.

Stimulation mit oxLDL führte zu spezifischen Histonmodifikationen, welche exemplarisch am Histon H3 und am Histon H4 untersucht wurden. Die Inkubation der Endothelzellen mit oxLDL induzierte eine Acetylierung an Histon H4 und eine Acetylierung, Phosphorylierung und Methylierung an Histon H3 sowohl global als auch an den Genpromotoren von *il8* und *mcp1*. Ferner kam es zeitabhängig zur Bindung der RNA-Polymerase II sowie der NF- κ B Untereinheit p65 an den *il8*- und *mcp1*-Genpromotor. Nach Stimulation mit oxLDL konnten eine zeitabhängige Rekrutierung

der Histon-Acetylase CBP/p300 sowie eine verminderte Rekrutierung der Histon-Deacetylasen HDAC1 und HDAC2 an die Promotoren beobachtet werden.

Simvastatin reduzierte auf Promotorebene sowohl die Acetylierung, Phosphorylierung und Methylierung des Histon H3 als auch die Bindung der NF- κ B Untereinheit p65, der RNA-Polymerase II und Histon-Acetylase CBP/p300 an diesen beiden Modellgenen. Dies war begleitet von einer Wiederherstellung der Bindung der Histon-Deacetylasen HDAC1 und HDAC2 an beide Promotoren. Somit konnte durch Simvastatin die Genexpression fördernde Acetylierung wieder revertiert werden.

Exemplarisch wurde auch der Einfluss von oxLDL auf die Expression der Histon-Deacetylasen HDAC1 und HDAC2 in kultivierten Endothelzellen untersucht. OxLDL reduzierten deren Expression. Dies ging einher mit einer Reduktion der globalen HDAC-Aktivität. Endothelzellen humaner explantierter Koronararterien zeigten innerhalb atherosklerotischer Plaques *in situ* ebenfalls eine verminderte Expression der HDAC2.

Diese Ergebnisse indizieren, dass Histonmodifikationen wesentlich an der oxLDL-vermittelten Zytokinproduktion in humanen Endothelzellen beteiligt sein können. Diese Arbeit lässt außerdem vermuten, dass der günstige Effekt von Statinen hinsichtlich kardiovaskulärer Erkrankungen auch auf der Beeinflussung von inflammatorischen Genen durch Histonmodifikationen basiert.

Schlagwörter: Atherosklerose, Endothelzellen, Zytokine, Statine, Histon, HDAC.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	SI-Bezeichnung für Mikroliter
µM	SI-Bezeichnung für Mikromolar
µmol	SI-Bezeichnung für Mikromol
A	Adenin
A. bidest	Aqua bidestillata
C	Cytosin
CBP	CREB-bindendes Protein
CCR2	CC Chemokin Rezeptor 2; Rezeptor für MCP-1 auf Monozyten
CD	Cluster of Differentiation
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
CREB	cAMP-response element
CRP	C-reaktives Protein, ein Entzündungsparameter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid-Triphosphat
EFG	Epidermal Growth Factor (Epidermaler Wachstumsfaktor)
FCS	Fetales Kälberserum
g	SI-Bezeichnung für Gramm
G	Guanin
Gcn5	Histon-Acetyltransferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
HAEC	Humane aortale Endothelzellen
HAT	Histon-Acetyltransferase
HDAC	Histon-Deacetylase
HeLa	Humane Endothelzellreihe eines Zervixkarzinoms
HMG-CoA	β-Hydroxy-β-Methylglutaryl-Coenzym-A
HMT	Histon-Methyltransferase
HUVEC	Humane Umbilikale Venöse Endothelzellen
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule

IFN- γ	Interferon γ (antiviraler Mediator)
I κ B α	Inhibitor kappa B
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton
l	Liter
LDL	Low Density Lipoproteine
Ldlr	LDL-Rezeptor
LOX-1	Lectin oxLDL Type 1-Rezeptor
LPS	Lipopolysaccharid
Lys	Lysin
M199	Medium 199
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
M-CSF	Makrophage Colony Stimulating Factor
MG	Molekulargewicht
min	Minuten
ml	SI-Bezeichnung für Milliliter
mM	SI-Bezeichnung für Millimolar
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NADPH	phosphorylierte Form des Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid
NF- κ B	Nukleärer Faktor κ B
nm	SI-Bezeichnung für Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
oxLDL	oxidierte Low Density Lipoproteine
p300	Protein 300, Histon-Acetyltransferase
PBS -/-	Phosphatgepufferte Salzlösung ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺
PCR	“Polymerase Chain Reaction”; Polymerase Kettenreaktion
POL II	RNA-Polymerase II
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat/ Laurylsulfat
Ser	Serin

Abkürzungsverzeichnis

SRA	Scavenger Receptor A
SR-PSOX	Scavenger receptor for phosphatidylserine and oxLDL
T	Thymin
T75	Zellkulturflasche mit 75 cm ² Kulturfläche
TNF α	Tumor Nekrose Faktor alpha
TSA	Trichostatin A (HDAC-Inhibitor)
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	12
1.1	Pathogenese der Atherosklerose	12
1.2	Das Endothel	14
1.2.1	Funktionen des Endothels	14
1.2.2	Endotheliale Dysfunktion in der Atherosklerose	15
1.3	Oxidierter LDL	17
1.4	MCP-1 und IL-8: Chemokine und ihre Rolle in der Atherogenese	20
1.5	Statine	23
1.6	Epigenetik	24
1.6.1	Histonstruktur	25
1.6.2	Histonmodifikationen	26
1.7	Fragestellung	31
2	Material und Methoden	33
2.1	Material	33
2.1.1.	Chemikalien	33
2.1.2.	Enzyme	34
2.1.3.	Antikörper für Chromatin-Immunpräzipitation und Western Blot	35
2.1.4.	Kulturmedien für HUVECs	35
2.1.5.	Puffer und Lösungen	36
2.1.6.	Verbrauchsmaterial	39
2.1.7.	Geräte	39
2.1.8.	Spezielle Reagenzien und Kits für CHIP	40
2.1.9.	Zellen	40
2.1.10.	Zellinhibitoren	40
2.1.11.	Spezielle Kits	40
2.2	Methoden	41
2.2.1	Isolation und Kultur von humanen Endothelzellen aus Nabelschnurvenen (HUVEC)	41
2.2.2	Kultur von humanen Endothelzellen aus der Aorta (HAEC)	41
2.2.3	Western Blot	42

2.2.4	Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)	45
2.2.5	ELISA	48
2.2.6	Western Blot und Proteinextraktion für säurelösliche Proteine.....	50
2.2.7	Fluorimetrischer HDAC-Aktivitätsassay.....	52
2.2.8	Gewebe- und Immunhistochemie.....	54
2.2.9	Statistische Auswertung	55
3	Ergebnisse	56
3.1	Oxidierter LDL induzieren die Expression von IL-8 und MCP-1 in HUVEC und HAEC	56
3.1.1	Stimulation von HUVEC und HAEC mit oxLDL induziert die Sekretion von IL-8 und MCP-1.	56
3.1.2	Simvastatin reduziert die Freisetzung von IL-8 und MCP-1 aus HUVEC und HAEC	58
3.2	Histonmodifikationen tragen zur oxLDL-vermittelten Zytokinexpression in humanen Endothelzellen bei	59
3.2.1	Oxidierter LDL induzieren globale Histonmodifikationen in HUVEC	59
3.2.2	TSA verstärkt die oxLDL-vermittelte Expression von IL-8 und MCP-1 in HUVEC und HAEC.....	60
3.3	Oxidierter LDL bewirken Modifikationen am <i>il8</i>- und <i>mcp1</i>-Genpromotor	62
3.4	Simvastatin inhibiert oxLDL-vermittelte Histonmodifikationen	63
3.5	Oxidierter LDL beeinflussen die Expression von HDAC1 und HDAC2 und die globale Aktivität der HDACs in Endothelzellen	65
3.5.1	Oxidierter LDL vermindern die Expression von HDAC1 und HDAC2	65
3.5.2	Oxidierter LDL und Simvastatin modulieren die globale Aktivität der HDACs	65
3.5.3	Die Expression von HDAC2 ist in Endothelzellen atherosklerotisch veränderter Koronarien in situ vermindert	67
4	Diskussion	70
4.1	Induktion der IL-8- und MCP-1 Expression nach Stimulation mit oxLDL	70

4.2	Oxidierter LDL induzieren Histonmodifikationen	71
4.3	Histonmodifikationen am <i>il8</i>- und <i>mcp1</i>-Genpromotor.....	73
4.4	Statine beeinflussen Histonmodifikationen.....	74
4.5	Oxidierter LDL und Histon-Deacetylasen (HDACs)	77
4.6	Ausblick	79
5	Summary	82
6	Literaturverzeichnis	84
7	Anhang	102
7.1	Publikationsverzeichnis.....	102
7.1.1	Originalarbeiten	102
7.1.2	Veröffentlichte Vorträge.....	102
7.2	Danksagung.....	103
7.3	Curriculum vitae	104
7.4	Eidesstattliche Erklärung	104

1 Einleitung

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind heutzutage in den westlichen Industrienationen die häufigste Ursache für Tod und Behinderung. Der größte Teil dieser Gruppe von Erkrankungen ist auf die Atherosklerose und deren Folgeerkrankungen zurückzuführen.

Die hauptsächlichsten klinischen Manifestationen der Atherosklerose sind die koronare Herzerkrankung (KHK) mit ihren Folgeerscheinungen wie Angina pectoris und Myokardinfarkt, der apoplektische Insult und die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK). In Deutschland sind 2006 etwa 360.000 Menschen an Erkrankungen des Herzkreislaufsystems gestorben, davon über 135.000 an der ischämischen Herzerkrankung und dem Myokardinfarkt (Statistisches Bundesamt Deutschland, 2006). Dies erklärt das große Interesse an den Entstehungsmechanismen der Atherosklerose.

1.1 Pathogenese der Atherosklerose

Die Atherosklerose ist eine multifaktorielle Erkrankung, die von genetischer Disposition und einer Vielzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren abhängig ist. Sie ist die häufigste pathologische Veränderung des vaskulären Systems und vorwiegend eine Erkrankung des Endothels und der glatten Muskelzellen der Arterienwände. Hauptsächlich betroffen sind die Koronararterien, arterielle Hirngefäße, Nierenarterien, Bauchaorta und die peripheren Gefäße der unteren Extremität. Durch einen entzündlich-proliferativen Prozess entwickeln sich eine Verdickung und Verhärtung der Arterienwände mit Einengung des Lumens und konsekutiver Minderversorgung des nachfolgenden Gewebes (Libby *et al.*, 2002; Lusis, 2000; Ross, 1999).

Definiert ist die Atherosklerose als variable Kombination von Veränderungen der Arterienintima mit fokaler Ansammlung von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen, fibrösem Gewebe und Kalziumablagerungen mit Veränderungen der Media in großen und mittleren elastischen und muskulären Arterien (WHO, 1958).

Obwohl die Ätiologie nicht eindeutig geklärt ist, sind seit langer Zeit Risikofaktoren für die Entstehung der Atherosklerose identifiziert: Hypercholesterinämie, Nikotinabusus, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus und psychosoziale Beeinträchtigung gelten als entscheidende Faktoren (Yusuf *et al.*, 2004). Interessanterweise wurde beobachtet,

dass Bluthochdruck, Diabetes und Nikotinabusus Faktoren sind, die das Risiko der Atherosklerosebildung dramatisch erhöhen. Jedoch ist die klinisch signifikante Atherosklerosebildung auch in Abwesenheit dieser Risikofaktoren möglich. Im Gegensatz dazu wurde die Atherosklerose unter einem bestimmten Plasmacholesterinwert (150 mg/dl) in der menschlichen Bevölkerung praktisch nicht nachgewiesen (Campbell *et al.*, 1998). Daraus wird abgeleitet, dass Hypercholesterinämie der entscheidende Risikofaktor in der Entstehung der Atherosklerose ist.

Als zentraler Ansatz zur Beschreibung der Kausalität gilt die *response-to-injury*-Hypothese (Ross, 1999), welche die Atherosklerose als inflammatorischen Prozess beschreibt. Die endotheliale Dysfunktion, der Verlust der Integrität und Homöostase des Endothels durch verschiedene Auslöser, gilt danach als das entscheidende Ereignis in der Entstehung. Läsionen des Endothels werden vor allem durch erhöhtes und modifiziertes LDL, freie Radikale, Bluthochdruck, Diabetes mellitus und infektiöse Mikroorganismen, jedoch auch durch die Kombinationen dieser Faktoren verursacht. Durch diese Schädigungen wird das Endothel entzündlich aktiviert. Dabei scheint die Kumulation von oxidiertem LDL in der Arterienwand unter anderem verantwortlich für die Entstehung des entzündlichen Prozesses (Davignon und Ganz, 2004; Faxon *et al.*, 2004). Erhöhte Serumspiegel von oxidierten LDL gelten demnach als wichtige Risikofaktoren (Tedgui und Mallat, 2006; Davignon und Ganz, 2004).

Durch die Störung der endothelialen Funktion kommt es zu einer vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Zelloberfläche, wie VCAM-1 und ICAM-1 (Galkina und Ley, 2007; Blankenberg *et al.*, 2003), was einen entscheidenden Schritt in der Entstehung der Atherosklerose darstellt und im Tierexperiment bestätigt wurde (Li *et al.*, 1993). Folgend kommt es zur Bindung von im Blut zirkulierenden Leukozyten an die Endothelzellen und anschließender Diapedese in die Arterienintima. Chemokine, insbesondere MCP-1 und IL-8, sind an diesem Prozeß maßgeblich beteiligt (Rosenson, 2004). Dies führt zur Ansammlung von Monozyten und T-Zellen innerhalb der Arterienwand (Hansson, 2001). In der Intima differenzieren die Monozyten zu Gewebsmakrophagen und exprimieren Scavenger-Rezeptoren wie SRA und CD36. Diese können beispielsweise durch Oxidation oder Glykosylierung modifizierte Lipoproteine binden und internalisieren, was letzten Endes über die Bildung von

cholesterolesterhaltigen zytoplasmatischen Einschlüssen zur Schaumzellmorphologie führt (Libby, 2002). Die Schaumzellen, genannt nach ihrem schaumartigen Erscheinungsbild unter dem Mikroskop, stellen durch Bildung von Fettstreifen (engl.: fatty streaks) die initiale Läsion der Atherosklerose dar.

Den T-Lymphozyten, welche neben den Makrophagen in einer atherosklerotischen Läsion zu finden sind, kommt eine immunregulatorische Rolle zu: nach Kontakt mit Antigenen wie oxLDL beeinflussen sie andere Zellen im Atherom. Erwähnenswert ist zum Beispiel die Bindung von CD154 an den CD40-Liganden auf Makrophagen, was zu Expression von Gewebefaktoren, Metalloproteinasen und proinflammatorischen Zytokinen führt (Libby, 2002). Die genaue Bedeutung der T-Lymphozyten in der Atherogenese ist jedoch noch nicht endgültig geklärt (Boisvert *et al.*, 2006; Daugherty *et al.*, 1997).

Im Falle einer weiter anhaltenden Entzündung etwa, durch Fortbestehen von Risikofaktoren wie Dyslipidämie, kommt es zur vermehrten Einwanderung von Leukozyten. Die Aktivierung dieser Zellen führt zur Freisetzung von hydrolytischen Enzymen, Zyto- und Chemokinen und Wachstumsfaktoren. Durch die Ansammlung von mononukleären Zellen, Proliferation von glatten Muskelzellen und vermehrte Bildung von extrazellulärer Matrix verdickt sich die Läsion und wird in ihrer Struktur umgebaut, so dass die Lipidansammlungen und nekrotisches Gewebe von einer fibrösen Kappe bedeckt werden, was auch als komplizierte Läsion bezeichnet wird (Ross, 1999).

Im späteren Verlauf kann die Volumenvergrößerung in der Arterienwand nicht länger kompensiert werden; es kommt zum Einbruch in das Gefäßlumen, zur Beeinflussung des Blutflusses und der Hämostase und schließlich zur klinischen Manifestation.

1.2 Das Endothel

1.2.1 Funktionen des Endothels

Das Endothel ist eine einlagige Zellschicht (Monolayer), die das Lumen aller Blutgefäße auskleidet. Es bildet eine physikalische Grenze zwischen Blut und umgebendem Gewebe und reguliert den Stoffaustausch zwischen beiden Kompartimenten. Endothelzellen haben autokrine und parakrine Funktionen. Das Endothel spielt eine

zentrale Rolle für die Kreislaufregulation, erbringt wichtige Leistungen, sowohl auf metabolischer als auch auf immunologischer Ebene und ist wesentlich am Erhalt der Gewebshomöostase beteiligt (Kumar *et al.*, 2004; Davignon und Ganz, 2004; Kharbanda und Deanfield, 2001; Kinlay *et al.*, 2001). Aus diesem Grund wurde dem Endothel die Rolle der größten und wichtigsten Drüse des Körpers zugeschrieben (Rubanyi, 1993).

Das Endothel reguliert durch die Sekretion von Mediatoren die Balance zwischen Vasodilatation und Vasokonstriktion, inhibiert und stimuliert die Proliferation glatter Muskelzellen, wirkt sowohl bei der Thrombogenese als auch bei der Fibrinolyse mit (Kinlay *et al.*, 2001; Luscher und Barton, 1997) und beeinflusst die vaskuläre Inflammation und Zellmigration (Kharbanda und Deanfield, 2001). Aufgrund seiner zentralen Position im Gefäß und seiner bedeutenden regulatorischen Funktion kommt dem Endothel eine Schlüsselrolle bei der Hemmung oder Entstehung der Atherosklerose zu.

1.2.2 Endotheliale Dysfunktion in der Atherosklerose

Die endotheliale Dysfunktion beschreibt die Störung der normalen physiologischen Endothelfunktionen. Sie führt zu einer Schädigung der arteriellen Gefäßwände und initiiert den atherosklerotischen Entzündungsprozess (Tedgui und Mallat, 2006; Davignon und Ganz, 2004).

Integritätsverlust des Endothels stört das Gleichgewicht zwischen Vasokonstriktion und Vasodilatation, beeinflusst die Aktivität der Proliferation glatter Muskelzellen, moduliert die Hämostase und initiiert Prozesse, die die Entstehung der Atherosklerose begünstigen. Erhöhte Gefäßpermeabilität, Thrombozytenaggregation, Adhäsion von Leukozyten und Produktion von Zytokinen sind einige dieser Folgen (Ross, 1999). Als ein Hauptmechanismus der endothelialen Dysfunktion gilt die gestörte und vom Endothel abhängige Vasodilatation, welche maßgeblich durch Stickstoffmonoxid (NO) vermittelt wird (Davignon und Ganz, 2004). NO ist ein potenter Vasodilatator (Drexler, 1998), der physiologischerweise durch eine erhöhte Scherspannung an den Endothelzell-membranen, ausgelöst durch eine Beschleunigung des Blutflusses, freigesetzt wird (Cooke und Tsao, 2001). Bemerkenswerterweise gibt es in letzter Zeit

vermehrt Hinweise darauf, dass NO auch Eigenschaften besitzt, die der Atherosklerose entgegenwirken (Paravicini und Touyz, 2008; Glass und Witztum, 2001). So verringert NO die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und die Adhäsion von Leukozyten an das Endothel, reduziert die Inflammation und Oxidation in den Gefäßwänden, unterstützt die Fibrinolyse und wirkt zellproliferativen Prozessen sowie der Thrombozytenaggregation entgegen (De Caterina *et al.*, 1995; Cooke und Tsao, 1994). Weiterhin vermindert NO die oxidative Modifikation von LDL-Cholesterol (Rubbo *et al.*, 2002) und steuert damit einem Hauptmechanismus des atherosklerotischen Prozesses entgegen (Steinberg und Witztum, 2002).

Die Abnahme der Konzentration von NO und damit der Beginn der endothelialen Dysfunktion, scheinen, trotz der Annahme eines multifaktoriellen Prozesses, wesentlich von oxidativem Stress und reaktiven Sauerstoffradikalen verursacht (Cai und Harrison, 2000). Dabei kommen viele verschiedene Interaktionen mit der Produktion und Aktivität von NO zum Tragen (Davignon und Ganz, 2004). Superoxidanionen beispielsweise inaktivieren NO und zerstören Kofaktoren, welche zur NO-Synthese benötigt werden (d'Uscio *et al.*, 2003). Eine Quelle dieser reaktiven Moleküle ist die endotheliale NADPH-Oxidase, welche durch proatherosklerotische Stimuli aktiviert wird (Griendling *et al.*, 2000). Herauszustellen ist im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls, dass auch oxidierte LDL die Produktion von NO inhibieren (Kinlay *et al.*, 2001). Weiterhin vermindern sie, im Gegensatz zu nativen LDL, die endothelvermittelte Gefäßrelaxation (Tanner *et al.*, 1991). Eine Assoziation der endothelabhängigen Vasodilatation mit dem Grad der Entzündungsreaktion wurde auch in klinischen Studien demonstriert. Bei Patienten mit einer koronaren Herzerkrankung war diese eng von der Höhe der CRP-Serumspiegel abhängig (Fichtlscherer *et al.*, 2004).

Interessanterweise bewirkt die endotheliale Dysfunktion nicht nur eine arterielle Entzündungsreaktion (Ross, 1999), auch das umgekehrte Konzept scheint zu gelten. So verursacht eine anhaltende Inflammation desgleichen eine endotheliale Dysfunktion, wie eine aktuelle Arbeit anhand der Parodontitis, einer ebenfalls mit der Atherosklerose assoziierten Erkrankung, zeigen konnte (Tonetti *et al.*, 2007). In klinischen Studien war der Grad der endothelialen Dysfunktion unabhängig von anderen Faktoren mit dem Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse vergesellschaftet und unterstreicht so deren Wichtigkeit (Lerman und Zeiher, 2005).

Wie dargelegt, stellt die endotheliale Dysfunktion einen bedeutenden und initialen Schritt in der Atherogenese dar und ist somit ein grundlegender Ansatzpunkt, um die Entstehung der atherosklerotischen Inflammation besser zu verstehen.

1.3 Oxidierte LDL

Lipoproteine sind nichtkovalent mit Lipiden verbundene Proteine, die hochmolekulare, wasserlösliche Komplexe variabler Zusammensetzung bilden. Sie unterscheiden sich in ihrer Größe und Dichte, bedingt durch unterschiedlich große Anteile an Proteinen (sogenannte Apoproteine) und Lipiden. Mit zunehmendem Protein- und abnehmendem Lipidanteil steigt deren Dichte. Durch Ultrazentrifugation können sie in verschiedene Fraktionen aufgetrennt werden. Darauf beruht die Einteilung der Lipoproteine in die fünf Hauptgruppen:

- Chylomikronen,
- Very Low Density Lipoproteine (VLDL),
- Intermediate Density Lipoproteine (IDL),
- Low Density Lipoproteine (LDL),
- High Density Lipoproteine (HDL).

LDL haben eine Dichte von 1,006-1,063 g/ml. Den hydrophoben Kern bilden veresterte Cholesterinmoleküle. Sie sind von einer Hülle aus Phospholipiden, unverestertem Cholesterin und einem Apoprotein B-100-Molekül, einem Proteinanteil der LDL, umgeben. Daneben enthalten LDL Apoprotein E. Sie werden in den Hepatozyten der Leber synthetisiert. Ihre physiologische Funktion besteht darin, Cholesterin zu peripheren Geweben zu transportieren, wo es über den LDL-Rezeptor mittels spezifischer Bindung an Apoprotein B-100 in die Zellen aufgenommen wird (Kumar *et al.*, 2004; Löffler und Petrides, 2002).

Die Oxidation von LDL ist ein komplizierter chemischer Prozess (Steinberg und Witztum, 1990). Sowohl der Proteinanteil als auch die Lipide können oxidativ verändert werden. Ebenso können die einzelnen Lipidbestandteile wie Cholesterin, Fettsäuren der Phospholipide, Cholesterolester und Triglyceride in unterschiedlichem Maße oxidiert werden. Das Ausmaß der Oxidation hängt dabei sowohl von den Bedingungen, unter denen es modifiziert wird, als auch von der zeitlichen Einwirkung dieser Modifikation ab.

Festzustellen bleibt hier, dass es kein einheitliches oxidiertes LDL gibt (Witztum und Steinberg, 1991), stattdessen existiert ein breites Spektrum, welches sich sowohl strukturell als auch funktionell unterscheidet.

Wo und wie die Oxidation von LDL *in vivo* stattfindet, ist bisher nicht genau beantwortet (Chisolm und Steinberg, 2000). LDL zirkulieren im Plasma und ebenso zwischen subendothelialelem Raum und Gefäßlumen. Antioxidantien des Plasmas bieten einen effektiven Schutz gegen die oxidative Modifizierung der LDL (Frei *et al.*, 1988). Dies weist darauf hin, dass die Oxidation von LDL größtenteils im subendothelialen Raum stattfindet. Dort scheint jede an der Entstehung der Atherosklerose beteiligte Zellart, beispielsweise Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Makrophagen, zur Oxidation befähigt (Steinberg, 1997a). Es wurde gezeigt, dass die Oxidation einen Kontakt von LDL zur Zielzelle voraussetzt und im Fall der Endothelzellen zelluläre Lipoxygenasen daran beteiligt zu sein scheinen (Parthasarathy *et al.*, 1989). Jedoch werden auch kleine Fraktionen von oxidierten LDL im Plasma gefunden und erst kürzlich gab es wieder vermehrt Beweise dafür, dass diese zirkulierenden oxLDL mit koronarer Herzkrankheit assoziiert sind (Tsimikas *et al.*, 2005).

Oxidierte LDL, als Form der modifizierten LDL, werden von Scavenger-Rezeptoren, wie SRA, CD36, LOX-1 und SR-PSOX (Nakajima *et al.*, 2006) der Makrophagen erkannt und besitzen somit eine Schlüsselrolle bei der Entstehung von Schaumzellen und damit auch der Atherosklerose (Kodama *et al.*, 1988; Henriksen *et al.*, 1982). Erst 1997 konnte ein neuer Rezeptor für oxLDL, LOX-1, auf Endothelzellen identifiziert werden (Sawamura *et al.*, 1997). Bis zu diesem Zeitpunkt waren oxidierte LDL in der sogenannten „OxLDL-Hypothese“ nur mit der Aufnahme der oxLDL von Makrophagen und der Bildung von Schaumzellen in Zusammenhang gebracht worden, nicht jedoch mit der endothelialen Dysfunktion, welche die atherosklerotische Läsion initiiert. Die heutige Hypothese geht davon aus, dass die Oxidation von LDL ein frühes essentielles Ereignis der Atherosklerose ist und dass oxidierte LDL, nicht jedoch native LDL, sowohl zu deren Einleitung als auch zu deren Progression notwendig sind (Nakajima *et al.*, 2006).

Die proatherosklerotischen Effekte von oxidierten LDL sind zahlreich. So bewirken sie Nekrose, Apoptose und Proliferation von glatten Muskelzellen, interferieren mit der durch das Endothel vermittelten Gefäßweitstellung und wirken prokoagulant (Chisolm

und Steinberg, 2000; Steinberg, 1997b). Zusätzlich zu ihrer Anreicherung in Makrophagen wirken oxidierte LDL proinflammatorisch und vermitteln die Chemotaxis von Monozyten in die Gefäßwände (Rosenson, 2004). Zum Beispiel aktiviert oxidiertes LDL den Transkriptionsfaktor NF- κ B, der die Expression von vielen proinflammatorischen Genen reguliert (Andalibi *et al.*, 1993).

Weiterhin induzieren oxLDL, im Gegensatz zu nicht modifizierten LDL, die Freisetzung von MCP-1 aus Endothelzellen, was zur Adhärenz und Transmigration von Blutleukozyten führt (Cushing *et al.*, 1990). Im Gegensatz dazu reduziert oxLDL, welches in den höchsten Konzentrationen innerhalb der Arterienwand nachzuweisen ist, CCR2, den Rezeptor für MCP-1 auf Monozyten. Dies führte zur Annahme, dass MCP-1 mehr in den Prozess der Einwanderung in die Intima als in die Entwicklung der atherosklerotischen Läsion involviert ist (Han *et al.*, 2000). Ferner stimuliert oxLDL, aber nicht natives LDL, die Sekretion von IL-8 aus Endothelzellen (Claise *et al.*, 1996). Studien von Yeh *et al.* unterstützen die Beobachtung, dass oxidierte Phospholipide, eine bioaktive Komponente von modifizierten LDL, IL-8-mRNA und -Proteinsynthese in HAECs induzieren (Yeh *et al.*, 2001).

Eine Zusammenfassung einiger der bisher erwähnten Effekte von oxidierten LDL auf Endothelzellen ist in Abbildung 1.1 dargestellt.

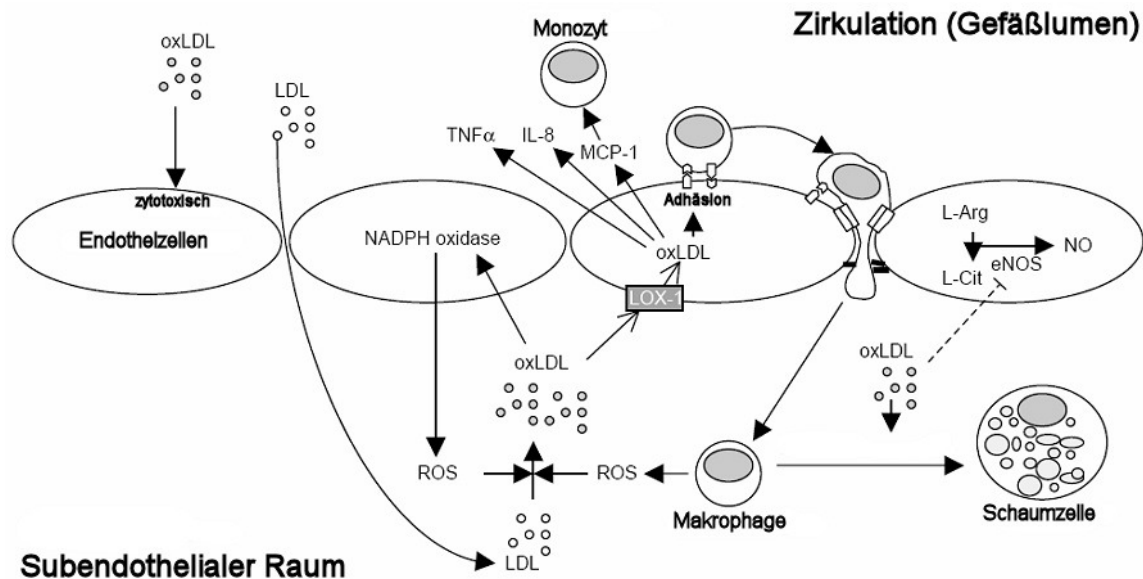


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung verschiedener durch oxLDL-induzierter endothelialer Effekte. (Abbildung modifiziert nach Rosenson 2004)

Oxidierte LDL (oxLDL) wirken direkt zytotoxisch oder werden erst im subendothelialen Raum, unter anderem durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS), modifiziert. Sie können in Endothelzellen über den LOX-1-Rezeptor (lectin-like oxidized LDL receptor-1) aufgenommen werden und induzieren dort proinflammatorische Zytokine, besonders IL-8 und MCP-1, die zur Adhäsion und zur Transmigration von Monozyten führen. Weiterhin hemmen sie (gestrichelte Linie) die endotheliale NO-Synthase (eNOS) und vermindern damit die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO). Die eingewanderten Makrophagen nehmen die oxidierten LDL über Scavenger-Rezeptoren auf und differenzieren zu Schaumzellen.

In dieser Arbeit wurden humane Endothelzellen mit oxidierten LDL stimuliert, mit dem Ziel, die durch oxidierte LDL induzierte Inflammation in humanen Endothelzellen besser zu verstehen.

1.4 MCP-1 und IL-8: Chemokine und ihre Rolle in der Atherogenese

Seit einigen Jahren ist durch viele Studien die These gestützt worden, dass die Entzündung eine wichtige Rolle in der Entstehung und Progression von kardiovaskulären Krankheiten besitze (Schober *et al.*, 2004; Libby, 2002). Besondere Aufmerksamkeit kam dabei Signalen zu, die eine zelluläre Infiltration in die Gefäßwände bewirken.

Chemokine (chemotaktische Zytokine) sind kleine, Heparin bindende Proteine (8 – 10 kDa), deren Hauptaufgabe darin besteht, im Blut zirkulierende Leukozyten zum Ort der Entzündung zu dirigieren (Rot und von Andrian, 2004; Gerard und Rollins, 2001). Weiterhin wird ihnen eine Rolle bei der Aktivierung von Leukozyten und Entzündungsregulation zugeschrieben (Reape und Groot, 1999; Terkeltaub *et al.*, 1998).

Es gibt etwa 50 humane Chemokine, die aufgrund ihrer Unterschiede in Struktur und Funktion in drei Hauptgruppen eingeteilt werden können. Die größte Familie sind die CC Chemokine. Die Bezeichnung richtet sich nach zwei konservierten Cysteinen, die bei CC Chemokinen in der Sequenz direkt aneinander angrenzen, während bei CXC Chemokinen, der zweitgrößten Gruppe, noch eine Aminosäure dazwischen liegt. Die dritte Familie, die CX3C Chemokine, besteht aus nur einem bekannten Vertreter, dem Fraktalkin (FK oder CX3CL1). Ob ein Chemokin eine Wirkung auf eine Zelle hat, hängt von deren Rezeptorenbesatz für das jeweilige Chemokin ab (Charo und Taubman, 2004).

Chemokine vermitteln ihre Wirkung auf die Zelle über die Aktivierung von 7-transmembranäre Domänen aufweisende, G-Protein gekoppelte Rezeptoren in der Zellmembran. Ihre Bindung an ihren jeweiligen Rezeptor aktiviert eine Signalkaskade, welche unter anderem die Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) aktiviert, den intrazellulären Inositoltriphosphat- und Kalziumspiegel anhebt, die Aktin-Anordnung und Zellform ändert und intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden, wie Rho- und MAP-Kinasen aktiviert. Solch ein Rezeptor auf Monozyten ist CCR2, welcher der Bindungspartner von MCP-1 ist (Charo und Taubman, 2004; Boring *et al.*, 1998).

Grundlegend betrachtet, stellen CXC Chemokine, als Vertreter sei IL-8 zu nennen, Agonisten für neutrophile Granulozyten dar, während CC Chemokine, zum Beispiel MCP-1, agonistische Funktionen auf mononukleäre Zellen ausüben (Tedgui und Mallat, 2006).

Das Einwandern von Monocyten in die Gefäßwand ist, wie bereits erwähnt, ein frühes Schlüsselereignis in der Entstehung der atherosklerotischen Läsion. Es wird durch inflammatorisch aktiviertes Endothel induziert. (Tedgui und Mallat, 2006; Gu *et al.*, 1998). MCP-1 ist ein Schlüsselmediator in diesem Geschehen. *In vivo* konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass die Abwesenheit von MCP-1, beispielsweise durch Deletion des *mcp1*-Gens, eine signifikante Verminderung der Einwanderung von

Monozyten und Bildung der atherosklerotischen Intimaläsion bewirkte (Gosling *et al.*, 1999; Gu *et al.*, 1998). Die Expression von MCP-1 scheint durch NF- κ B-vermittelnde Mechanismen mitreguliert zu werden (Shin *et al.*, 2002).

Neben der klassischen Rolle von MCP-1 bei der Rekrutierung von monozytären Zellen zum Ort der Entzündung ist wenig über die Funktion in nichtmonozytären, an der Atherosklerose beteiligten Zellen, wie Endothelzellen und glatten Muskelzellen, bekannt (Boisvert, 2004). *In vivo* durchgeführte Untersuchungen zeigen, dass MCP-1 und CCR2 wesentlich zur atherosklerotischen Inflammation beitragen (Dawson *et al.*, 1999; Boring *et al.*, 1998). Jedoch wurde eine Progression der Atherosklerose nach Ausschalten des MCP-1-Rezeptors CCR2 (-/-) in Knockout-Mäusen beobachtet (Dawson *et al.*, 1999; Boring *et al.*, 1998). Daher scheinen auch andere Chemokine in diesen Prozess involviert zu sein.

IL-8 kommt dabei eine bedeutende Rolle zu. So konnte die vermehrte Produktion von IL-8 aus Schaumzellen der Intima atherosklerotisch veränderter Gefäße bestimmt werden (Apostolopoulos *et al.*, 1996). Einige Studien der letzten Zeit zeigten, dass neben MCP-1 auch IL-8 eine Funktion bei der Aktivierung von Monozyten und deren Migration in die Intima besitzt (Huo *et al.*, 2001; Gerszten *et al.*, 1999). IL-8 scheint innerhalb dieses Prozesses eher in die frühe Phase des *Rolling*, des durch Selektine vermittelten Entlangrollens der Monozyten am Endothel und der festen Adhäsion der Monozyten an aktiviertem Endothel, als an der Transmigration beteiligt zu sein (Boisvert, 2004; Gerszten *et al.*, 1999). Die zentrale Rolle von MCP-1 und IL-8 für die Entwicklung der atherosklerotischen Inflammation konnte erst kürzlich durch deren Rezeptorexpression und konsekutive Akkumulation von Makrophagen innerhalb arterieller Gefäßwände im Mausmodell gezeigt werden (Boisvert *et al.*, 2006).

Die Bedeutung von MCP-1 und IL-8 für die Atherosklerose wurde jedoch auch in klinischen Studien aufgezeigt. So wurden bei Patienten mit einer koronaren Herzerkrankung oder erhöhten kardiovaskulären Risikofaktoren erhöhte Serumspiegel von MCP-1 gefunden (Martinovic *et al.*, 2005). Bei Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie konnte eine erhöhte IL-8-Freisetzung aus Blutmonozyten bestimmt werden (Holven *et al.*, 2003). In einer aktuellen Langzeitstudie war IL-8 das einzige von zehn getesteten Chemokinen, welches unabhängig von anderen Zytokinen ein Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse voraussagen konnte (Inoue *et al.*, 2008).

Die genauen Wirkweisen der Chemokine und deren Zusammenwirken bei der Entstehung der Atherosklerose sind bisher nicht aufgeklärt. Viel weist aber darauf hin, dass sie einen wesentlichen Anteil an der inflammatorischen Komponente der Atherosklerose haben.

1.5 Statine

Statine sind eine hochpotente Medikamentengruppe, welche die Cholesterinbiosynthese inhibieren und LDL-Plasmaspiegel wirkungsvoll senken (Liao und Laufs, 2005; Yoshida, 2003). Sie hemmen kompetitiv das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Cholesterinbiosynthese, die HMG-CoA-Reduktase, welche β -Hydroxy- β -Methylglutaryl-Coenzym-A (HMG-CoA) zu Mevalonat reduziert. In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass Statine zur primären und sekundären Prävention der koronaren Herzerkrankung beitragen (Pedersen *et al.*, 2000; Shepherd *et al.*, 1995; West of Scotland Coronary Prevention Study Group, 1998). Simvastatin ist ein Vertreter dieser Gruppe.

Allerdings scheint der Gesamteffekt der Statine größer zu sein als von der alleinigen Senkung des Plasmalipidspiegels zu erwarten wäre, was auf Wirkmechanismen jenseits der Cholesterinsenkung schließen lässt (Davignon und Leiter, 2005). Diese, nicht vom Cholesterin abhängigen pleiotropen Effekte, umfassen die Verbesserung der endothelialen Funktion (Tousoulis *et al.*, 2005), die Stabilisierung von atherosklerotischen Plaques (Corti *et al.*, 2001), Verminderung von oxidativem Stress (Aviram *et al.*, 1998), der Oxidation von LDL (Tavridou *et al.*, 2006) und Inflammation (Jialal *et al.*, 2001) und nicht zuletzt die Inhibierung der intravasalen Thrombenbildung (Davignon, 2004). Auch konnte gezeigt werden, dass Atorvastatin und Pitavastatin in HUVECs zur Verminderung der IL8- und MCP-1-mRNA führt (Morikawa *et al.*, 2002). Weiterhin wurden günstige extrahepatische Effekte auf das Immunsystem, das zentrale Nervensystem und den Knochenstoffwechsel beobachtet (Li und Losordo, 2006; Liao und Laufs, 2005). Die klinische Bedeutung dieser Effekte ist noch nicht abschließend geklärt, wird aber gegenwärtig in vielen Studien untersucht (Davignon und Leiter, 2005).

Viele dieser pleiotropen Effekte könnten auf die Interferenz mit intrazellulären Signalkaskaden wie den kleinen GTPasen zurückzuführen sein, welche in ihrer

Funktion von Syntheseprodukten des Mevalonat abhängig sind (Yoshida, 2003; Goldstein und Brown, 1990). So interferieren Statine nicht nur mit der Cholesterinbiosynthese, sondern hemmen auch die Synthese der nichtsteroidalen Isoprenoide, welche über die Aktivierung von kleinen GTPasen wie Rho, Ras und Rac an Vorgängen der zellulären Inflammation, Proliferation, Migration, Vasokonstriktion und Oxidation beteiligt sind (Brown *et al.*, 2006; Davignon und Leiter, 2005). Auch scheinen Statine die proinflammatorisch wirkende Aktivierung von NF- κ B zu vermindern und so, zumindest zum Teil, die Abnahme der MCP-1- und IL-8-Produktion zu bewirken (Shin *et al.*, 2002). Auch dieser Mechanismus scheint über die kleinen GTPasen vermittelt (Brown *et al.*, 2006).

Welchen Einfluss Statine, insbesondere Simvastatin, auf genetische und epigenetische Regulationsmechanismen in Endothelzellen ausüben, ist bisher unbekannt und sollte in dieser Arbeit näher untersucht werden.

1.6 Epigenetik

Die Genetik beschäftigt sich mit der Organisation der DNA in Genen und regulatorischen Sequenzen, ihrer Veränderung durch Mutationen und ihrer Vererbung an weitere Generationen. Unter Epigenetik versteht man Vorgänge, die sich der DNA übergeordnet („epi“) abspielen und dazu führen, dass die genetische Information aktiv wird und zelluläre Prozesse in Gang gesetzt werden, sie beruht jedoch nicht auf einer Änderung der Basensequenz der DNA. Sie subsumiert Modifikationen von DNA, Chromatin und posttranskriptionellen Mechanismen, welche sogar von einer Zell- oder Organismen-Generation in die nächste vererbt werden können (Roloff und Nuber, 2005). Die Gesamtheit der genetischen Information eines Organismus ist hinsichtlich der Expression einzelner Gene äußerst heterogen. Bestimmte Genabschnitte unterliegen einer Transkription häufiger, andere wiederum seltener. Die genetische Information ist hoch organisiert und interessanterweise kann ein identischer Genotyp einer Zelle zu verschiedenen Phänotypen führen (Holliday, 2006). Verantwortlich dafür sind epigenetische Regulationen, die der eigentlichen Gentranskription vorgelagert sind. Molekulare Mechanismen dieser Regulation sind DNA-Methylierungen und Histonmodifikationen (Egger *et al.*, 2004).

1.6.1 Histonstruktur

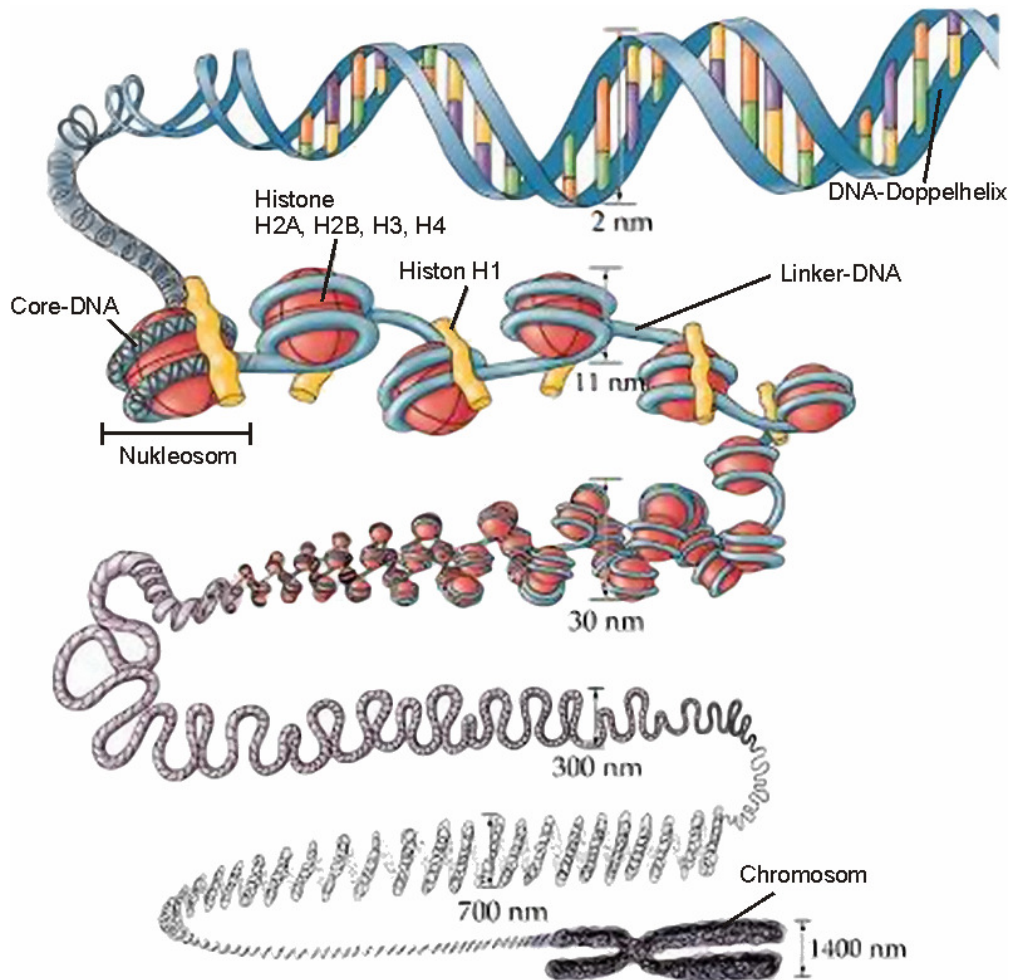


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung eines Nucleosoms und der Chromatinstruktur

Das Nucleosom ist die funktionelle, sich wiederholende Einheit des Chromatins. Sie besteht aus einem so genannten Nucleosomkern, der sich aus den verschiedenen Histonen zusammensetzt. Dabei sind 146 Basenpaare der DNA (Core-DNA) in 1,65 Windungen einer linksgängigen Helix um ein Oktamer der Histonproteine H2A, H2B, H3 und H4 gewunden. Die Nucleosomenkerne sind über Linker-DNA-Einheiten miteinander verbunden. An diese binden die Histone H1, die an der Organisation des Chromatins zu Strukturen höherer Ordnung bis hin zum Chromosom beteiligt sind. Modifizierte Abbildung nach Sadava (Sadava *et al.*, 1997).

Das eukaryote Genom ist im Zellkern in Form des Chromatins zu Strukturen höherer Ordnung gepackt. Die grundlegende, kleinste sich wiederholende Einheit dieser Anordnung ist das Nucleosom (Khorasanizadeh, 2004), bei dem 146 Basenpaare der DNA linksgängig um vier Core-Histone gewickelt sind, die sich jeweils aus zwei Histonen H2A, H2B, H3 und H4 aufbauen (Kornberg und Lorch, 1999; Luger *et al.*,

1997). Das fünfte, das Nucleosom abschließende Histon H1, wird benötigt, um eine 30nm-Faser zu bilden - eine übergeordnete Struktur, die einer Helix aus Nucleosomen entspricht. So entsteht eine hoch geordnete Struktur, die während der Metaphase des Zellzyklus als Chromosom mikroskopisch erkennbar ist (Abbildung 1.2).

Jedes Core-Histon besteht hauptsächlich aus einer globulären Domäne. Einzig das aminoternale Ende wird an der Nucleosomenoberfläche präsentiert und ist dort enzymvermittelten posttranslationalen Modifikationen ausgesetzt (Spotswood und Turner, 2002).

1.6.2 Histonmodifikationen

Aminoternale Histonenden sind kovalenten Modifikationen unterworfen, die genabhängig zur Steigerung oder Verminderung der Expression eines Gens führen können (Strahl und Allis, 2000). Diese Modifikationen umfassen zum Beispiel Acetylierung durch Histon-Acetyltransferasen (HATs), Methylierung durch Histon-Methyltransferasen (HMTs), Phosphorylierung sowie ADP-Ribosylierung und Ubiquitinierung (Spotswood und Turner, 2002; Hansen *et al.*, 1998). Diese Modifikationen führen zu Ladungsänderungen, welche die Zugänglichkeit des DNA-Histon-Komplexes für Proteine regulieren (Spotswood und Turner, 2002).

Histonmodifikationen sind vielerlei Wechselwirkungen unterworfen. So werden verschiedene Histonmodifikationen auf einem oder mehreren Termini erst nach Stattfinden einer anderen Modifikation vollzogen oder im umgekehrten Fall scheinen bestimmte aminoternale Änderungen nicht jede beliebige weitere Modifikation zuzulassen (Egger *et al.*, 2004; Strahl und Allis, 2000).

Diese Kombination von Histonmodifikationen, die zu spezifischen Änderungen der Genexpression führt, wird als die Hypothese des Histon-Codes verstanden (Strahl und Allis, 2000). Zu diesen Ereignissen zählt die Bindung von regulatorischen Proteinen, welche die Chromatinstruktur für die Transkription zugänglich machen und letztendlich zur Genexpression führen oder diese regulieren können (Grant, 2001; Roth *et al.*, 2001).

Die Histon-Acetylierung ist eine der am besten verstandenen Histonmodifikationen und besitzt elementare Bedeutung in der Regulation der Gentranskription (Struhl, 1998). Sie

wird durch ein Gleichgewicht antagonistischer Funktionen von Histon-Acetyltransferasen (HATs) und Histon-Deacetylasen (HDACs) eingestellt (Hess-Stumpp, 2005). Es handelt sich dabei um einen dynamischen und reversiblen Prozess, welcher von HATs und HDACs reguliert wird. Grundlegend geht eine hohe Histon-Acetylierung (erhöhte HAT-Aktivität) mit erhöhter Transkription, ein erniedrigter Acetylierungsgrad (erhöhte HDAC-Aktivität) mit Repression der Genexpression einher (de Ruijter *et al.*, 2003; Roth *et al.*, 2001). Auf der Ebene der DNA bewirkt eine Acetylierung hierbei eine Öffnung der Chromatinstruktur für die Bindung von Transkriptionsfaktoren, wohingegen Deacetylierung zur Kondensation des Chromatins führt und somit den Zugang von Proteinen zur DNA restringiert (Abbildung 1.3).

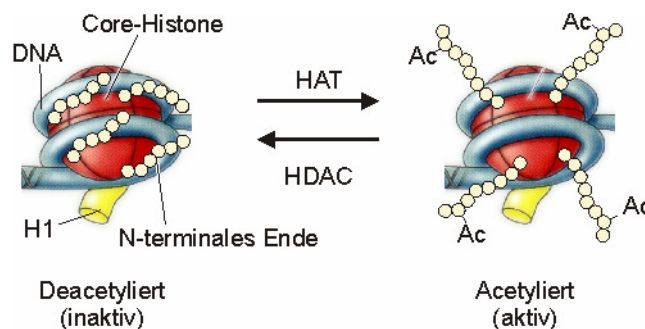


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung des acetylierten und deacetylierten Zustands der Chromatinstruktur

Die N-terminalen Histonenenden können durch Histon-Acetyltransferasen (HATs) acetyliert (Ac) werden, so dass sie aus dem Nukleosomen herausragen und die DNA zugänglich machen (aktivierter Zustand) oder sie werden durch Histon-Deacetylasen (HDACs) deacetyliert und versetzen die Chromatinstruktur in einen nicht ablesbaren Zustand. Modifiziert nach Sadava (Sadava *et al.*, 1997).

Präferentiell spielen sich die Acetylierungen an den Lysinresten der aminoterminalen Enden ab, besonders am Lysin-14 des Histon H4 (Muegge, 2002), wodurch die elektrische Ladung der Core-Histone verändert wird und es zur Aufhebung der Deckung der DNA durch die aminoterminalen Enden und zur Dekondensation des Chromatins kommt (Roth *et al.*, 2001). Dies erlaubt die Bindung von basalen Transkriptionsfaktoren und schließlich der RNA-Polymerase II, welche die Gentranskription initiiert (Barnes *et al.*, 2005). Eine Aktivierung von zum Beispiel proinflammatorischen Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B führt zur Bindung an spezifische Erkennungssequenzen der DNA

und anschließend zur Interaktion mit Molekülen mit Coaktivator-Funktion wie dem CREB-bindenden Protein (CBP), p300 und p300/CBP-assoziierten Faktor (PCAF). Diese Moleküle wirken ebenso als molekulare Schalter auf die Gentranskription ein; sie besitzen zum Teil intrinsische HAT-Aktivität (Roth *et al.*, 2001; Brownell *et al.*, 1996; Ogryzko *et al.*, 1996). Grundlegend lassen sich die Histon-Acetyltransferasen in drei große Familien einteilen. Die GNAT-Familie, zu der die HATs Gcn5, PCAF, Elp3 und ATF-2 gehören, die MYST-Familie, welche die HATs MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2, Tip60, Esa1 und MOF umfaßt und die CBP/p300-Familie (Roth *et al.*, 2001). Darüber hinaus sind jedoch noch mehr als ein Dutzend weiterer Proteine mit HAT-Aktivität bekannt (Yang, 2004). *In vivo* liegen die Histon-Acetyltransferasen immer in Form von Multiproteinkomplexen vor, welche neben ihrer Substratspezifität auch die Substratspezifität bestimmen (Carrozza *et al.*, 2003; Grant *et al.*, 1999). So acetyliert freies Gcn5 hauptsächlich den aminoterminalen Lysinrest K14 des Histon H3. Nach Einbindung in einen Proteinkomplex erweitert sich dieses Spektrum auf die Lysinreste 9, 14 und 18. In dieser Arbeit wurde vor allem dem HAT-Komplex CBP/p300 Beachtung zuteil, da er weniger substratspezifisch ist und daher als globaler Regulator der Transkription gilt. Neben der Hauptrolle der HATs als Modulatoren der Gentranskription stehen sie auch im Verdacht, andere, die DNA betreffende Mechanismen wie DNA-Replikation, DNA-Rekombination und DNA-Reparatur, zu beeinflussen und zusätzlich zu den Histonen auch andere Proteine als Substrate zu akzeptieren (Chen *et al.*, 2001a).

Histon-Deacetylasen spielen im Gegenzug dazu eine entscheidende Rolle in der Suppression der Genexpression, indem sie einer Hyperacetylierung der Core-Histone entgegenwirken. Bislang konnten in humanen Zellen elf HDACs, die Histone deacetylieren, identifiziert werden, welche nach Sequenzhomologien in drei Hauptklassen (I, II, IV) eingeteilt werden (de Ruijter *et al.*, 2003; Thiagalingam *et al.*, 2003; Minucci und Pelicci, 2006).

Der Klasse I zugehörig sind die HDACs 1, 2, 3 und 8, welche sich von der aus der Hefe stammenden HDAC yRPD3 ableiten und hauptsächlich im Zellkern lokalisiert sind (Fischle *et al.*, 2001).

Die Klasse II schließt die HDACs 4, 5, 6, 7, 9 und 10 ein, ist insgesamt in weniger Zelltypen zu finden, jedoch sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma vertreten (Verdin *et al.*, 2003). Sie sind Homologe der Hefe yHAD-1.

Die Klasse IV besteht nur aus HDAC 11 (Minucci und Pelicci, 2006). Weiterhin ist noch eine vierte Klasse von HDACs, die als Klasse III oder Sirtuine bezeichnet werden, bekannt, die auf den Transkriptionsrepressor γ Sir2 der Hefe zurückgehen (Verdin *et al.*, 2003).

Wie bereits erwähnt, führt die Deacetylierung von Histonen zu geschlossenen Chromatinstrukturen, die unzugänglich für den Transkriptionsapparat sind. Damit die HDACs in der Lage sind, diese Inaktivierung zu vermitteln, müssen sie aktiv an die entsprechende Promotorregion rekrutiert werden, da sie selbst nicht direkt mit der DNA oder den entsprechenden Histonproteinen interagieren (Wade, 2001). Dies geschieht durch Komplexbildung der HDACs mit Transkriptionsfaktoren oder Wechselwirkung mit anderen Proteinen oder Corepressoren wie NuRD oder mSin3, wodurch die HDACs wahrscheinlich, je nach Zusammensetzung des Komplexes, different reguliert werden (Ayer, 1999). Ebenfalls scheint dadurch eine Spezifität bei der Auswahl der abzuschaltenden Gene erreicht zu werden (Fernandes *et al.*, 2003; Jones und Shi, 2003). Auch gibt es Hinweise darauf, dass die verschiedenen HDACs unterschiedliche Acetylierungsmuster erkennen und die Regulation von unterschiedlichen Genen zum Ziel haben (Peterson, 2002). Wie die HATs können auch die HDACs direkt mit Proteinen, beispielsweise der Komponente p65 des NF- κ B, in Interaktion treten und diese deacetylieren (Ashburner *et al.*, 2001).

Trichostatin A (TSA) ist ein nicht-selektiver, die Klasse I und II beeinflussender HDAC-Inhibitor (Kim *et al.*, 2006; Yoshida *et al.*, 2003). In den letzten Jahren konnten viele Arbeiten zeigen, dass TSA in inflammatorisch aktivierten Zellen zur verstärkten Expression inflammatorischer Gene führte (Keslacy *et al.*, 2006; Barnes *et al.*, 2005; Ito *et al.*, 2000). Dies lässt vermuten, dass HDACs unter anderem für die Repression inflammatorischer Gene verantwortlich sind (Barnes *et al.*, 2005).

Eine weitere wichtige Histonmodifikation ist die Phosphorylierung. Seit der Erstbeschreibung Ende der 60er Jahre wurde sie an allen Histonen nachgewiesen und es konnten auch bedeutende Phosphorylierungsstellen wie das auf Histon H3 lokalisierte Serin 10 identifiziert werden (Wei *et al.*, 1998). Interessanterweise ist diese Modifikation sowohl mit der Gentranskription als auch der Mitose und Meiose assoziiert, obwohl beiden Mechanismen eine gegensätzliche Veränderung der Chromatinstruktur zugrunde liegt (Nowak und Corces, 2004; Prigent und Dimitrov, 2003). Die Histon-

Phosphorylierung wurde mit der Aktivierung von „immediate early response“-Genen wie c-fos, c-myc und c-jun während der Interphase in Verbindung gebracht (Thomson *et al.*, 1999; Mahadevan *et al.*, 1991). Diese Gene sind direkt mit intrazellulären Signalkaskaden wie den MAPK verknüpft (Clayton und Mahadevan, 2003). Eine solche stimulationsabhängige H3-Phosphorylierung betrifft nicht das gesamte Genom, sondern nur eine bestimmte Gruppe von Genen und es könnten bei dieser Genaktivierung weitere intrazelluläre Signalsysteme wie NF- κ B involviert sein (Vanden *et al.*, 2003).

Nicht nur die reine Phosphorylierung oder Acetylierung ist mit der Transkription in Verbindung zu bringen. Es wurden auch doppelte Modifikationen des Histon H3 beobachtet. So führte die Zellstimulation mit dem Wachstumsfaktor EGF zusätzlich zur bestehenden Phosphorylierung an Serin 10 zur Acetylierung des Lysinrest 14 (Cheung *et al.*, 2000b). In einem anderen Beispiel konnte der Synergismus von Phosphorylierung (Lysin 14 des Histon H3) und Acetylierung (Serin 10) aufgezeigt werden, wodurch es zu einer erhöhten transkriptionellen Aktivität kam (Lo *et al.*, 2000). Wie sich Phosphorylierung und Acetylierung gegenseitig beeinflussen, ist jedoch noch nicht abschließend geklärt.

Der Methylierung von Histonen wurde erst vor einigen Jahren eine Bedeutung in Bezug auf die Regulation der Gentranskription zugesprochen. Seit dem Jahr 2000 wurde eine Vielzahl von Histon-Methyltransferasen (HMTs) identifiziert und es wurden Wechselwirkungen zwischen den Histonmodifikationen nachgewiesen (Sims, III *et al.*, 2003; Kouzarides, 2002). Die spezifische Methylierung von Lysinresten findet am Histon H3 an den Positionen 4, 9, 27, 36 und 79 sowie am Histon H4 an Position 20 statt (Kouzarides, 2002; Sims, III *et al.*, 2003). Die Histonposition H3-K9 (Lysin 9) scheint eine überaus wichtige epigenetische Modifikationsstelle zu sein, da sie sowohl acetyliert als auch methyliert werden kann und je nach Modifikation wird die Bildung von Euchromatin oder Heterochromatin unterstützt (Jenuwein und Allis, 2001). Die H3-K4-Methylierung steht in Beziehung mit Euchromatin und einer aktivierten Transkription (Schneider *et al.*, 2004; Strahl *et al.*, 1999). Unterstützt wird diese durch Acetylierungen am Lysinrest 9 des Histon H3. Die H3-K4- und die H3-K9-Methylierung haben gegensätzliche biologische Wirkungen, jedoch wurde auch beschrieben, dass sowohl H3-K4 als auch H3-K9 methyliert vorliegen können (Byrd und Shearn, 2003; Beisel *et al.*, 2002). Diese besondere Art der doppelten Methylierung wird mit der Aktivierung von

Genen in Verbindung gebracht, die normalerweise einer Repression unterliegen (Ng *et al.*, 2003). Auch scheint der Methylierungsgrad an H3-K4 eine entscheidende Rolle zu spielen (Sims, III *et al.*, 2003). Die Methylierung an H3-K4 vermindert die H3-K9-spezifische Methylierung, wirkt so der Bildung von Heterochromatin entgegen (Nishioka *et al.*, 2002) und verhindert weiterhin die Bindung des Histon-Deacetylase-NuRD-Repressorkomplexes an H3 (Zegerman *et al.*, 2002). Die Dimethylierung von H3-K4 als globale epigenetische Markierung am transkriptionellen Chromatin könnte diese generellen Mechanismen bewirken (Santos-Rosa *et al.*, 2002).

Abschließend sei zusammengefasst, dass die Acetylierung des Histons H3 an Lysin 14 (H3-K14) ebenso wie die Phosphorylierung von Serin 10 (H3-S10) und die Methylierung von H3-K4 im Allgemeinen zur Aktivierung von Transkriptionsvorgängen führen.

Die Regulation inflammatorischer Vorgänge auf epigenetischer Ebene ist seit einigen Jahren das Ziel intensiver Forschung. Eine Aktivierung proinflammatorischer Gene führt zur Expression von Zytokinen, Chemokinen, synthetisierenden Enzymen für entzündungsaktivierende Mediatoren und deren Rezeptoren und Adhäsionsmolekülen (Barnes *et al.*, 2005). Die Regulation inflammatorischer Mechanismen durch HDACs und HATs ist ein wesentlicher Bestandteil dessen. So konnte gezeigt werden, dass CBP/p300 die Acetylierung und Bindung von p65 an die DNA mit konsekutiver transkriptionaler Aktivität zur Folge hat (Kiernan *et al.*, 2003). Die HDACs kehrten diesen Prozess um. HDAC1 und HDAC2 deacetylierten acetylierten NF- κ B, begünstigten dessen Bindung mit seinem Inhibitor I κ B α und terminierten so dessen Aktivität (Chen *et al.*, 2001b). Eine weitere Arbeit konnte zeigen, dass inflammatorische Stimuli wie LPS MAPK-abhängig zu einer Phosphorylierung respektive Phosphoacetylierung des Histons H3 an den Gen-Promotoren von IL-8 und MCP-1 in dendritischen Zellen führten (Saccani *et al.*, 2002).

1.7 Fragestellung

Oxidiertes LDL kann die Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine IL-8 und MCP-1 aus humanen Endothelzellen erhöhen, wodurch eine Inflammation der Gefäßwände gefördert und die Progression der Atherosklerose unterstützt werden können (Tedgui

und Mallat, 2006; Gosling *et al.*, 1999; Gu *et al.*, 1998; Claise *et al.*, 1996).

In dieser Arbeit wurde die Hypothese geprüft, ob Histonmodifikationen die oxLDL-induzierte Expression proinflammatorischer Zytokine beeinflussen. Darüber hinaus sollte in diesem Kontext die Rolle des Statins Simvastatin, eines der potentesten Medikamente zur Prävention der lipoproteininduzierten Atherosklerose, untersucht werden. Dabei ergaben sich folgende Fragestellungen:

- Bewirkt oxLDL die Freisetzung von IL-8 und MCP-1 aus HUVEC und HAEC?
- Moduliert Simvastatin die Freisetzung von IL-8 und MCP-1 aus HUVEC und HAEC?
- Induziert oxLDL Histonmodifikationen global und an den Promotorregionen von IL-8 und MCP-1 in humanen Endothelzellen?
- Welche Auswirkung hat eine Inhibition von HDACs auf die Bildung von IL-8 und MCP-1?
- Haben wichtige modulierende Moleküle der Histone wie CBP/p300, NFκB und HDACs einen Anteil an der Regulation am Genpromotor von *il8* und *mcp1*?
- Welche Auswirkung hat Simvastatin auf die beobachteten Histonmodifikationen?
- Hat oxLDL einen Einfluss auf globale HDAC-Aktivität und im Besonderen auf die Expression der HDAC1 und HDAC2?
- Übt Simvastatin einen Einfluss auf die HDAC-Expression in oxLDL-stimulierten Endothelzellen aus?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1. Chemikalien

Laborchemikalien, Puffergrundsubstanzen, Lösungsmittel und Grundsubstanzen zur Zellkultur wurden, soweit nicht explizit angegeben, von den Firmen Roth (Karlsruhe), Sigma (Deisenhofen), Merck (Darmstadt), Gibco Life Technologies (Eggenstein), Roche (Mannheim), Serva (Heidelberg), PAA (Linz, Österreich) und Boehringer (Mannheim) bezogen. Sie waren von analytischer Qualität.

Produkt	Hersteller
β -Mercaptoethanol	Serva
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Merck
Aceton	Merck
Acrylamid	Serva
Agarose	Promega
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva
Amphotericin	Boehringer
Antipain	Sigma
Aprotinin	Sigma
Eisessig	Merck
Ethanol	J.T. Baker
Ethidiumbromid	Sigma
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco
Formaldehyd 37%	Sigma
Gelatine	Sigma
Glycin	Serva
Hepes	Roth
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumhydrogenphosphat	Merck
Leupeptin	Sigma
L-Glutamin	Gibco
Magnesiumchlorid	Sigma
Methanol	Merck

Produkt	Hersteller
N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED)	R & D Systems
Natriumchlorid	Merck
Natriumdeoxycholat, minimum 97%	Sigma
Natriumhydrogencarbonat	Merck
Natriumhydrogenphosphat	Merck
Nonidet P 40	BioChemika
Orange G	Sigma
Oxidiertes LDL	Biotrend
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma
Pepstatin A	Sigma
Phenylmethylsulphonylfluorid (PMSF)	Sigma
Schwefelsäure 95-97%	Merck
Simvastatin	Merck
Sodium Fluorid	Sigma
Sodium Orthovanadat	Sigma
Sodium Pyrophosphat	Sigma
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Serva
TNF α	R & D Systems
Trichloressigsäurelösung 50%	Merck
Trizma Base, minimum 99,9% titration	Sigma
Trypsin EDTA	Gibco Life Technologies
Tween 20	Sigma
Xylol	J.T. Baker

2.1.2. Enzyme

Produkt	Hersteller
Proteinase K	Merck
Ribonuclease A (Rnase A)	AppliChem

2.1.3. Antikörper für Chromatin-Immunpräzipitation und Western Blot

Zielantigen	Spezies	Hersteller
Aktin (I-19)	Ziege	Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA
Anti-Acetyl-Histone H4	Kaninchen	Cell Signaling, Beverly, MA
Anti-Dimethyl(Lys-4)-Histone H3	Kaninchen	Cell Signaling, Beverly, MA
Anti-Histone H3	Maus	Cell Signaling, Beverly, MA
Anti-Histone H4	Kaninchen	Cell Signaling, Beverly, MA
Anti-Phospho(Ser-10)-Acetyl(Lys-14)-Histone H3	Kaninchen	Cell Signaling, Beverly, MA
CBP (C-20)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA
HDAC 1 (H-51)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA
HDAC 2 (H-54)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA
NF- κ B p65 (C-20)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA
p300 (C-20)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA
RNA-Pol II (N-20)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA

2.1.4. Kulturmedien für HUVECs

Kultivierungsmedium:

Endothel Basal Medium 500 ml, 5 ml L-Glutamin (200 mM), 0,2 ml Amphotericin B (500x), 0,1 ml EGF (200 μ g/ml), 10% FCS, 7 ml Penicillin/Streptomycin (10000 μ g/ml).

Stimulationsmedium (ELISA, Western Blot, HDAC-Aktivitätsassay und CHIP):

Endothel Basal Medium 500ml, 1% FCS.

Stimulationsmedium (Histonextraktion):

Endothel Basal Medium (Volumen nach Bedarf).

Vor Zugabe wurde das FCS zur Inaktivierung von Komplementfaktoren für 30 Minuten auf 56 °C erhitzt. Es wurde unter sterilen Bedingungen gearbeitet. Alle Zusätze wurden steril filtriert.

2.1.5. Puffer und Lösungen

Zellkultur:

Gelatinelösung: 5,0 g Gelatine, Aqua bidest ad 100,0 ml

Zum Lösen wurde die Gelatine auf 80 °C erhitzt und die Lösung anschließend steril filtriert.

Puffer und Gele für Western Blot:

Phospho-Proteinwaschpuffer: 50,0 ml $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 50,0 ml NaF, 5,0 ml Na_3VO_4 , Aqua bidest ad 505,0 ml.

Lyse-Puffer (1,0ml): 100,0 μl Tris HCl (50 mM, pH 7,4), 50,0 μl Nonidet P 40, 10,0 μl PMSF (1 mM), 5,0 μl Antipain (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 5,0 μl Leupeptin (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 5,0 μl Pepstatin (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 833,0 μl Phospho-Proteinwaschpuffer.

Laemmli-Puffer (1x): 0,8 ml Glycerol, 1,0 ml Tris-HCl (0,5 M, pH 8,3), 1,6 ml SDS (10%), 0,4 ml Bromphenolblau (1%), 0,4 ml 2-Mercaptoethanol (1%; erst kurz vor Gebrauch hinzufügen), 3,8 ml Aqua bidest.

Running-Puffer (5x): 72,0 g Glycin, 15,0 g Tris Base, 5,0 g SDS, Aqua bidest ad 1000,0 ml.

Running-Puffer (1x) für Gel-Elektrophorese: 200,0 ml Running-Puffer (5x), Aqua bidest ad 1000,0 ml.

Blot-Puffer (10x): 144,0 g Glycin, 30,0 g Tris Base; Aqua bidest ad 1000,0 ml.

Blot-Puffer (1x): 200,0 ml Methanol, 80,0 ml Blot-Puffer (10x), Aqua bidest ad 1000,0 ml.

Sammelgel-Puffer 0,5M Tris-HCl; pH 6,8: 6,0g Tris Base, Aqua bidest ad 100,0ml.

Trenngel-Puffer 1,5M; pH 8,8: 18,15g Tris Base, Aqua bidest ad 100,0ml.

Sammelgel: 6,0 ml Aqua bidest, 2,5 ml Sammelgel-Puffer, 1,33 ml Acrylamid/Bisacrylamid, 0,1 ml SDS (10%), 50 μl Ammoniumpersulfat, 10 μl TEMED (erst kurz vor

Gebrauch hinzugeben).

Trenngel: Aqua bidest (nach MG des Zielproteins), 2,5 ml Trenngel-Puffer, Akrylamid/
Bisakrylamid (nach MG des Zielproteins), 0,1 ml SDS (10%), 50 µl Ammoniumpersulfat,
5 µl TEMED (erst kurz vor Gebrauch hinzugeben).

Zusammensetzung der Gele nach Akrylamidgehalt:

Akrylamidgehalt:	5%	7%	10%	13%	16%
Akrylamid 40%	6,10 ml	5,70 ml	4,85 ml	4,10 ml	3,35 ml
Aqua bidest	1,25 ml	1,65 ml	2,5 ml	3,25 ml	4,0 ml

Ponceau-S-Proteinfärbungslösung: 1,0 g Ponceau S, 50,0 ml Eisessig, Aqua bidest
ad 1000,0 ml.

IL-8-ELISA:

Carbonatpuffer (0,1 M, pH 9,5): 4,2 g NaHCO₃, 1,78 g Na₂CO₃, Aqua bidest ad 500,0
ml.

Block-Puffer (1x PBS, 11% FCS): 45,0 ml 1x PBS -/-, 5,0 ml FCS.

Stoplösung: 27,47 ml H₂SO₄ 97%, 472,53 ml Aqua bidest.

Waschpuffer: 1x PBS -/-, 0,05% Tween20.

Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP):

Fixierlösung: 40 ml 1x PBS -/-, 1% Formaldehyd.

ChIP-Ripa-Puffer: 150 mM NaCl, 10 mM Tris (pH 7,5), 1 mM EDTA, 1% Nonidet P 40,
1% Desoxycholat, 1% Aprotinin (direkt in das gewonnene Zelllysat geben).

“High Salt”-Puffer: 2 M NaCl, 10 mM Tris (pH 7,5), 1 mM EDTA, 1% Nonidet P 40,
0,5% Desoxycholat.

TE-Puffer: 10 mM Tris (pH 7,5), 1 mM EDTA, Aqua bidest ad 500,0 ml, 10 mM Tris (pH
7,5), 1 mM EDTA.

Eluierungspuffer: 10 mM Tris (pH 7,5), 1 mM EDTA, 1% SDS, Aqua bidest ad 20,0 ml, 10 mM Tris (pH 7,5).

TAE-Puffer (50x): 242,0 g Tris Base (pH 8,7), 50 mM EDTA, 51,1 ml Eisessig.

TAE-Puffer (1x): 20,0 ml TAE-Puffer (50x), Aqua bidest ad 1000,0 ml.

PCR-Ansatz (1x): 3,0 µl der isolierten immunpräzipitierten DNA, 3,0 µl 10x Hotstart Puffer, 0,6 µl dNTPs (10 mM), 0,3 µl sense-Primer (100 µM), 0,3 µl antisense-Primer (100 µM), 0,5 µl Hotstart Taq, 16,9 µl Aqua bidest.

Orange G (5x): 5,0 ml Glycerol, 1,0 ml EDTA (0,5 M), 1,0 ml Orange G 2%, 0,1 ml SDS 10%, 2,9 ml Aqua bidest, 5,0 ml Glycerol (99%ig).

Orange G (1x): 1,0 ml Orange G (5x), Aqua bidest 4,0 ml.

Agarosegel (2%ig): 2,0 g Agarose, 100,0 ml TAE-Puffer (1x), Die Agarose wird unter Erhitzen in der Mikrowelle im Puffer gelöst.

Proteinextraktion für säurelösliche Proteine

Lysepuffer: 10 mM HEPES Puffer (pH 7,9), 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 1,5 mM PMSF (erst kurz vor Gebrauch hinzugeben), 0,5 mM DTT (erst kurz vor Gebrauch hinzugeben).

Laemmli-Puffer (4x): 0,8 ml Glycerol, 1,0 ml Tris-HCl (0,5M, pH 8,3), 1,6 ml SDS (10%), 0,4 ml Bromphenolblau (1%), 0,4 ml 2-Mercaptoethanol (1%; erst kurz vor Gebrauch hinzufügen), 0,95 ml Aqua bidest.

HDAC-Aktivitätsassay

Lysepuffer A: 20 µl HEPES (500 mM, pH 7,9 bei 4°C), 100 µl MgCl₂ (15mM), 100 µl KCL (100mM), 1µl DTT (1M), 779µl Aqua bidest.

Lysepuffer B: 40 µl HEPES (500 mM, pH7.9), 250 µl 25%(v/v) Glycerol, 100 µl KCL (100 mM), 1 µl EDTA (250 mM), 10 µl PMSF (100 mM), 1 µl DTT (1 M), 598 µl Aqua

bidest.

2.1.6. Verbrauchsmaterial

Soweit nicht anders angegeben, stammten verwendete Plastikmaterialien wie Kulturbedältnisse, Reagenzröhrchen und Plastikgefäße von den Firmen Nunc (Wiesbaden), Falcon (Heidelberg), Sarstedt (Sevelen) und Eppendorf (Hamburg). Cell scraper wurden bezogen von Costar (Cambridge, MA, USA) und Hybond-ECL-Membranen von Amersham Biosciences (Freiburg).

2.1.7. Geräte

Produkt	Hersteller
Chirurgiesauger P130	Medap
Digitalkamera (Amedia)	Olympus
Eismaschine	Ziegra
Feinwaagen	Mettler
Fluorometer FluoroMax-2	ISA SPEX/ Jobin Yvon
Forschungsmikroskop BX 60	Olympus
Heizschüttler Thermomixer comfort	Eppendorf
Kühlschränke (4 °C, -20 °C, -80 °C)	Liebherr
Kühlzentrifuge MIKRO 24-48R	Hettich
Mikrowelle	Siemens
MS2 Minishaker (Vortexer)	IKA®
Odyssey Infrared Imaging System	Licor Biosciences
Pipetten (10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl)	Eppendorf
Sonifikator Sonoplus	Bandelin
Sterilbank Lamin Air Model 1.2	Holten
Sterilisator Systec V-65	Heraeus
Thermocycler (Gradient Cycler)	Biozym
UVICON Spectrophotometer 922	Bio-Tek Kontron Instruments
Wasserbad	Kottermann Labortechnik
Zellkultur-Inkubator HERA CELL 240	Heraeus
Zentrifuge Rotanta/ RP	Hettich

2.1.8. Spezielle Reagenzien und Kits für ChIP

Produkt	Hersteller
dNTPs	Boehringer
Hotstart Taq DNA-Polymerase	Qiagen
PCR Purification Kit	Qiagen
Protein A Agarose Immunpräzipitations Reagenz	Santa Cruz
Protein G PLUS Agarose Immunpräzipitations Reagenz	Santa Cruz

2.1.9. Zellen

Humane umbilikale venöse Endothelzellen (HUVEC)

Die Nabelschnüre für die Gewinnung von humanen Endothelzellen aus der Nabelvene wurden freundlicherweise aus der medizinischen Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe des Humboldt Krankenhauses (Berlin) zur Verfügung gestellt.

Humane aortale Endothelzellen (HAEC)

Die HAEC sind primäre Endothelzellen aus der Aorta und stammten von der Firma Cambrex (Cambrex Bio Science Walkersville, Inc.). Sie wurden von der Firma aus humanem Gewebe (aortalem Endothel) isoliert und im Labor bei -196 °C in flüssigem Stickstoff für die weitere Anzucht aufbewahrt.

2.1.10. Zellinhibitoren

Zellinhibitor	Funktion	Hersteller
Simvastatin	HMG-CoA-Reduktase-Hemmer Hemmer der kleinen GTPasen	Calbiochem
Trichostatin A (TSA)	HDAC-Inhibitor	Sigma

2.1.11. Spezielle Kits

Produkt	Hersteller
Fluorometrischer HDAC-Aktivitätsassay Kit	BIOMOL, Hamburg, Germany

2.2 Methoden

2.2.1 Isolation und Kultur von humanen Endothelzellen aus Nabelschnurvenen (HUVEC)

Die Zellen stammen aus Nabelschnüren der Station für Gynäkologie und Geburtshilfe des Humboldt-Krankenhauses und wurden in Hank's-HEPES Puffer mit Magnesium und Calcium gesammelt und bei 4 °C aufbewahrt.

Die Isolation der HUVECs erfolgte nach einem im Labor etablierten modifizierten Protokoll von Jaffé et al. (Jaffe *et al.*, 1973). Unter Verwendung einer Laminar Airflow-Sicherheitswerkbank wurde die Nabelschnurvene unter sterilen Kautelen kanüliert (Braunüle®, 18G, Braun Melsungen), mit sterilem HBSS +/- ausgespült und anschließend mit 0,025% Typ II Kollagenase für 20 Minuten gefüllt und inkubiert. Gewonnen wurden die Endothelzellen durch mehrfaches vorsichtiges Massieren und Ausspülen mit M199. Anschließend wurden die so gewonnenen Zellen für 10 Minuten bei 350 x g zentrifugiert, das Pellet wurde in Endothel Basal Medium aufgenommen. Die Primärkultur der Endothelzellen wurde in Endothel Basal Medium mit 10% inaktiviertem FCS im Brutschrank (37 °C, 5% CO₂) gelagert.

Nach 4 bis 5 Tagen zeigten die in T75-Flaschen gezüchteten Zellen Konfluenz. Die nach immunologischen und morphologischen Kriterien Jaffés (Jaffé und Posnett, 1984) charakterisierten humanen Endothelzellen wuchsen innerhalb dieser Zeit zu einem kopfsteinpflasterartigen Monolayer und waren CD31-, vWF-, E-Selektin- und Vimentin-positiv und Zytokeratin-negativ. Sie konnten nach Verwendungszweck auf T75-Flaschen, 10cm-Schalen, 24-, 48- oder 96-Wellplatten gesplittet werden. Alle verwendeten Gefäße wurden mit 0,5%iger Gelatinelösung behandelt und inkubiert. Die konfluenten Endothelzellen wurden mit sterilem PBS +/- gewaschen, mittels 0,5% Trypsin-EDTA abgelöst und anschließend wieder in Kulturmedium aufgenommen.

2.2.2 Kultur von humanen Endothelzellen aus der Aorta (HAEC)

Die Zellen wurden tiefgefroren bezogen. Die Zellen wurden aufgetaut und in Endothelzellwachstumsmedium (EGM-2, CellSystems, St. Katharinen) mit 2% FCS auf gelatinisierten T25-Kulturflaschen ausgesät und bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Die

Zellen wurden jeden zweiten Tag mit EGM-2 mit 2% FCS gefüttert. 48 Stunden vor der Stimulation wurden die Zellen bei 90% Konfluenz durch Trypsinieren subkultiviert. 10.000 bis 50.000 Zellen wurden in 500 µl EGM-2 mit 2% FCS resuspendiert und in 24-Loch-Platten überführt.

2.2.3 Western Blot

Im Western Blot werden durch SDS-Gelelektrophorese das Gesamtprotein oder einzelne Fraktionen einer Probe nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Anschließend werden die aufgetrennten Proteine auf eine Membran (Nitrozellulose) transferiert und können jetzt mit spezifischen Antikörpern immundetektiert werden.

Vorbereitung der Zellen (HUVEC)

Vor Stimulationsbeginn wurden die in 10cm-Schalen kultivierten Endothelzellen vom Kultivierungsmedium in das Stimulationsmedium überführt. Zur Gewinnung eines Wertes benötigte man konfluente Zellen einer 10cm-Schale. Zellinhibitoren wurden 1 Stunde vor Stimulationsbeginn dem Stimulationsmedium zugegeben. Oxidiertes LDL wurde in den verwendeten Konzentrationen unter sterilen Bedingungen hinzu pipettiert.

Extraktion der löslichen Gesamtproteine

Die Endothelzellen in den jeweiligen Gefäßen wurden mit eiskaltem PBS gewaschen und nach Hinzugabe von Lysepuffer auf die Zellen mit einem Zellschaber abgekratzt. Die verwendete Lysepuffermenge war vom Volumen des Kulturgefäßes abhängig (T75-Flaschen: 120 µl; 10cm-Schalen: 90 µl). Das so gewonnene Lysat aus 1×10^6 Zellen wurde in Eppendorf-Reaktionsgefäßen für 3 Minuten bei 4 °C und 8000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein weiteres Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C gelagert, 5 µl wurden zur Proteinbestimmung nach Bradford verwendet.

Proteinbestimmung nach Bradford

Die Quantifizierung der Proteinmenge wurde mit dem BioRad Protein-Assay (BioRad) nach Bradford durchgeführt. Möglich war dies, da keine interferierenden Substanzen vorlagen. Das Verfahren beruht auf der Tatsache, dass Coomassie Brilliant Blue®, ein

grünbrauner Farbstoff, sein spektrometrisches Absorptionsmaximum von 465 nm auf 595 nm nach Bindung von basischen oder aromatischen Aminosäuren ändert.

In einer Mikrotiterplatte wechselt nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten die Proteinlösung die Farbe von grünbraun nach blau. 5 µl der Proteinlösung werden hierbei mit 200 µl 1:5 verdünnter Farbstofflösung inkubiert. Die Absorption wird bei 595 nm in einem Spektralphotometer gemessen. Über eine Albumin-Standardkurve (1-8 µl einer Stocklösung mit 1 mg/ml Protein) wird die Proteinkonzentration bestimmt.

Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

SDS, ein anionisches Detergens, ist in der Lage, mit einem Massenverhältnis von 1,4:1 an das Polypeptidgerüst der Proteine zu binden. Dadurch bekommen die Proteine gemäß ihrer Länge eine negative Außenladung und können nach ihrem Molekulargewicht im Gel getrennt werden. Das Gel wurde nach dem Molekulargewicht der gesuchten Proteine ausgesucht und zusammengestellt:

Zielantigen	Molekulargewicht	Akrylamidgehalt des Gels
Aktin (I-19)	41 kDa	10%
Anti-Acetyl-Histone H4	11 kDa	16%
Anti-Dimethyl(Lys-9)-Histone H3	15 kDa	16%
Anti-Histone H3	17 kDa	16%
Anti-Histone H4	11 kDa	16%
Anti-Phospho(Ser-10)-Acetyl(Lys-14)-Histone H3	17 kDa	16%
HDAC 1 (H-51)	55 kDa	10%
HDAC 2 (H-54)	55 kDa	10%

Das den Vernetzungsgrad bestimmende Verhältnis von Acrylamid zu Bisacrylamid betrug 19:1. Vor SDS-Kontakt wurde das Protein mit Gelladepuffer in einem Verhältnis von 1:1 versetzt und für 3 Minuten unter Schütteln auf 95 °C erhitzt. Nach Abkühlen der Probe wurde jeweils 80 µg Protein separat in je eine Geltasche aufgetragen; ebenso ein Marker (Amersham Rainbow high) zur Größenbestimmung der Proteine.

Die anschließende Gelelektrophorese erfolgte in BioRad Mini-Gel-Kammern im

Laemmli-Puffer-System bei 100V für 2 Stunden.

Protein-Blot

Die durch die Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden nun auf eine Membran übertragen, um eine optimale Detektion durch Antikörper zu gewährleisten. Möglich wird dieser Transfer, da negativ geladene Proteine zur Anode wandern.

Nach erfolgter Elektrophorese wurde das Trenngel vorsichtig aus der Elektrophoresekammer entnommen, für 15 Minuten im Blotting-Puffer äquilibriert und mit einer sauberen Glaspipette auf eine ebenfalls puffergetränkte Hybond-Nitrozellulosemembran (Amersham) aufgerollt um störende Luftblasen zu entfernen. Zum Proteintransfer wurden unter und auf die Trenngel-Membran-Schicht je zwei puffergetränkte Lagen 3M-Whatman-Filterpapiere (Whatman) aufgebracht und die Blotvorrichtung (Transblot, München) gemäß Herstellerangaben verwendet. Nach Überführung in die Blotkammer wurde zusammen mit eiskaltem Blotpuffer bei 100 V, 4 °C und maximaler Stromstärke für 1 Stunde geblottet. Zur Beurteilung des Transfererfolges wurde die Membran anschließend reversibel mit Ponceau-S gefärbt. Anschließend wurde sie mit Aqua bidest so lange gewaschen, bis die Färbung entfernt war.

Antikörperexposition

Zur Absättigung unspezifischer Bindungen wurde die Membran mit Odyssey Licor Biosciences Block-Puffer® (Licor Biosciences, Lincoln, NE, USA) für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde sie für eine Stunde (bei Raumtemperatur) bzw. über Nacht (bei 4 °C) mit einem primären Antikörper gegen das Zielprotein im frischen Blockpuffer exponiert. Nach dreimaligem Waschen (jeweils 5 Minuten) mit PBS mit 1% Tween wurde dann bei Raumtemperatur für 45 Minuten ein dem Detektionsverfahren angepasster sekundärer Antikörper hinzugegeben. Entsprechend der Spezies des primären Antikörpers wurde für die Odyssey Licor Biosciences® Detektion ein an IRDye 800 oder an Cy5.5 gekoppelter sekundärer Antikörper verwendet. In Vorversuchen wurde die optimale Antikörperverdünnung bestimmt. Sie lag für die primären Antikörper bei 1:1000; für die sekundären Antikörper bei 1:2000.

Detektion

Die an den primären Antikörper gebundenen, mit IRDye 800 oder Cy 5.5 markierten sekundären Antikörper, wurden mittels des lasergestützten Odyssey Infrared Imaging System® detektiert und mit einer entsprechenden Software nach den Herstellervorgaben bearbeitet. So konnte die Proteinbande nicht nur dargestellt, sondern auch ihre Intensität bestimmt werden.

2.2.4 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Die Chromatin-Immunpräzipitation ist eine *in situ* Technik, die die Lokalisierung modifizierter Histone, Transkriptionsfaktoren und nicht-chromosomaler Proteine sowie die Zuordnung derselben zu bestimmten DNA-Abschnitten ermöglicht. Sie stellt eine physiologische Repräsentation nukleärer Ereignisse dar, die in den Prozessierungsvorgang der DNA involviert sind und ist somit eine geeignete Methode zur Erforschung von Transkriptionsfaktorbindung und Änderungen in der Chromatinstruktur (Spencer *et al.*, 2003). Die Methode ermöglicht die Quantifizierung eines Proteins, das mit einem bestimmten Genort assoziiert ist.

Vorbereitung der Zellen (HUVEC)

Am Tag vor der Stimulation (etwa 12 Stunden vor Stimulationsbeginn) wurden die in T75-Flaschen kultivierten Endothelzellen von dem Kultivierungsmedium in das Stimulationsmedium überführt, um etwaige Stimulationen von Kinasen zu minimieren. Zur Gewinnung eines Wertes benötigte man konfluente Zellen einer T75-Flasche (ca. 6×10^6 / ml). Zellinhibitoren wurden 1 Stunde vor Stimulationsbeginn dem Stimulationsmedium zugegeben. Oxidiertes LDL wurde in den verwendeten Konzentrationen unter sterilen Bedingungen hinzu pipettiert.

Vernetzung durch Formaldehyd

Das Zellmedium wurde zunächst abgesaugt und die Zellen wurden für 1 Minute mit 37%igem Formaldehyd inkubiert. Dieses Verfahren diente dazu, Proteine, die an spezifische Sequenzen der DNA gebunden waren, an die DNA zu fixieren. Anschließend wurden die Zellen einmal mit eiskaltem 0,125 M Glycin in PBS -/-

gewaschen, dann in PBS +/- abgekratzt und zweimal für 5 Minuten bei 4 °C und 252 x g zentrifugiert und gewaschen. Die Zellen wurden in 2 ml ChIP-Ripa-Puffer lysiert.

Aufarbeitung des Zelllysates für die Immunpräzipitation

Das Lysat wurde vier Zyklen einer Sonifikation unterzogen. Ein Zyklus umfasste eine Minute Sonifikation bei 50% Power mit einer Sonde des Sonifikators (Bandelin Sonoplus) um das Chromatin in Fragmente zu schneiden. Anschließend erfolgte eine einminütige Pause. Die Proben befanden sich während dieser Prozedur auf Eis. Darauffolgend wurden verbleibende Zelltrümmer durch 20-minütiges Zentrifugieren bei 4 °C und 21530 x g entfernt, der Überstand aliquotiert und bei -80 °C aufbewahrt oder weiterverwendet.

Immunpräzipitation des Zielproteins

Je nach Zielprotein (Pol II (N-20), NFκB p65 (C-20), Anti-Histone H3, Anti-Histone H4, Anti-Acetyl-Histone H4, Anti-Phospho(Ser-10)-Acetyl(Lys-14)-Histone H3, Anti-Dimethyl(Lys-4)-Histone H3, CBP (C-20), p300 (C-20)) wurden verschiedene Antikörper eingesetzt und entsprechend den Empfehlungen des Herstellers im Lysat verdünnt. Die Antikörper-Inkubation wurde über Nacht bei 4 °C im Drehinkubator (Heidolph REAX2) durchgeführt. Anschließend wurde der Antikörper-Proteinkomplex mittels Protein A/G Agarose 1 Stunde bei 4 °C im Drehinkubator extrahiert. Um nicht mit Protein A/G assoziierte Proteine und DNA zu entfernen, wurden die Immunkomplexe zweimal mit ChIP-Ripa Puffer, einmal mit „High-Salt“-Puffer, erneut einmal mit ChIP-Ripa und abschließend einmal mit TE-Puffer gewaschen. Die Immunkomplexe wurden dann im Heizschüttler (Thermomixer comfort, Eppendorf) bei 30 °C und 1200rpm in 15 Minuten mit EB-Puffer (TE-Puffer mit 1% SDS) von der Protein A/G Agarose extrahiert.

Isolierung der immunpräzipitierten DNA

Zur Isolierung der mit immunpräzipitierten Proteinen assoziierten DNA wurden die Immunkomplexe zunächst für 30 Minuten bei 37 °C mit RNase (1 µg/ 20 µl) im Brutschrank und anschließend unter Zugabe von Proteinase K (1 µg/ 8 µl) für mindestens 6 Stunden (bei 37 °C), anschließend für genau 6 Stunden (bei 65 °C) im Thermocycler (Gradient Cyler, Biozym) verdaut.

Amplifikation der isolierten DNA durch Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine Methode um kleinste Mengen an DNA zu amplifizieren. Ein thermostabiles Enzym, die sogenannte Taq-DNA-Polymerase, vervielfältigt dabei einen durch zwei komplementäre Primer begrenzten DNA-Abschnitt in einem Zyklus aus drei Schritten. Zunächst erfolgt eine Trennung der DNA-Stränge (Denaturierung) durch hitzebedingtes Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen. In der zweiten Phase (Annealing/ Polymerisation) wird durch Senken der Temperatur eine Anlagerung der Primer an die Stränge bewirkt. Der Zyklus wird komplettiert durch die Elongation. Dabei füllt die DNA-Polymerase die inkompletten Stränge mit Nukleotiden auf.

Die DNA in ChIP-Versuchen wurde mittels PCR Purification Kits (Quiagen) nach Herstellerangaben extrahiert. Zur Amplifizierung der IL-8- und MCP-1-Promotor DNA wurde ein HotstarTaq®-Polymerase-Kit (Quiagen), wie im PCR-Ansatz unter 2.1.5 beschrieben, verwendet. Der PCR-Durchlauf bestand in folgenden Schritten, durchgeführt in der PCR-Maschine (Thermocycler (Gradient Cycler), Biozym):

Einmaliges Erhitzen auf 95 °C für 15 Minuten (Vordenaturierung zur vollständigen Trennung der DNA und Vorliegen von Einzelsträngen).

Für 34-36 Zyklen (je nach Antikörper und DNA-Gehalt):

94 °C für 20 Sekunden (Denaturierung),

60 °C für 20 Sekunden (Hybridisierung der Primer),

72 °C für 20 Sekunden (Elongation) und

Erhitzung auf 72 °C für 7 Minuten (finale Elongation).

Abschließend wurde die DNA auf 4 °C heruntergekühlt.

Analyse mittels DNA-Gelelektrophorese

Bei einer Gelelektrophorese werden Moleküle (Nukleinsäuren oder Proteine) gemäß ihrer ladungsbedingten Wanderungsgeschwindigkeit in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Das Feld wird an eine Gelmatrix angelegt.

Die PCR Produkte wurden in einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt, welches in horizontale Gelträger gegossen und in spezielle Elektrophoresekammern gegeben wurde. Diese Kammern enthielten 1x TAE als Laufpuffer. Die PCR Produkte wurden mit 5 µl 1x Orange G als Ladepuffer versehen und 15µl dieses Gemisches pro Probe

wurden in die Gelkammern pipettiert. Die Elektrophorese wurde für etwa 30 Minuten bei 100 V durchgeführt. Zur Visualisierung der DNA-Banden wurde das Gel mit Ethidiumbromid (1:25000 verdünnt), welches in die DNA-Stränge interkaliert, versehen. Durch Anregung mit UV-Licht können die aufgetragenen Banden sichtbar gemacht werden. Die Kontrolle von gleicher Quantität der Proben-DNA wurde in Form von Input-Proben ebenfalls über die DNA-Gelelektrophorese bewerkstelligt.

Die folgenden promotorspezifischen Primer wurden verwendet:

il8 sense 5'-AAGAAACTTTTCGTCATACTCCG-3', antisense 5'-TGGCTTTTTATATCA TCACCCTAC-3'.

mcp1 sense 5'-GCCTTTGCATATATCAGACAG-3', antisense 5'-CAGGCTTGTGCCGAGATGTTC-3'.

Auswertung der Gelelektrophorese

Mittels einer Digitalkamera (Olympus) und der Fotodokumentationssoftware Argus X1 v3.0 wurden die Gele über einer UV-Quelle fotografiert und die Ergebnisse auf diese Weise quantifiziert.

2.2.5 ELISA

IL-8 und MCP-1 wurden mittels Sandwich-ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) gemessen. Er dient der Quantifizierung von Interleukin 8 oder MCP-1 im Zellkulturüberstand. Möglich wird diese Messung, weil spezifische Antikörper IL-8 bzw. MCP-1 binden, welche sekundär mit einem enzymmarkierten Antikörper gekoppelt werden, der eine Farbreaktion katalysiert. Durch Vergleich mit einer Standardkurve kann die Konzentration von IL-8 bzw. MCP-1 bestimmt werden.

Vorbereitung der Zellen (HUVEC und HAEC)

Die Zellen wurden in 48- oder 24-Well-Platten kultiviert, bis sie konfluent waren. Es erfolgte ein Auswechseln des Kulturmediums durch Stimulationsmedium für HUVEC (Endothel-Basal-Medium, 1% FCS) oder HAEC (EGM-2). Anschließend wurden die Zellinhibitoren dazu pipettiert. Nach einer Stunde wurde mit oxLDL stimuliert.

Gewinnung und Aufarbeitung der Zellkulturüberstände

Die Zellüberstände wurden nach ca. 16 h Inkubationszeit in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt und bei 4 °C und 24980 x g für 10 min zentrifugiert um Zellreste zu entfernen. Anschließend wurden die Proben auf Eis gestellt und mit Blockpuffer im Verhältnis 1:500 verdünnt.

Humaner IL-8 ELISA

Zur Quantifizierung von IL-8 wurde ein Human IL-8 ELISA Set (BD Biosciences) verwendet. Dabei reagierte das in den Zellkulturüberständen enthaltene IL-8 in einer Antigen-Antikörper-Reaktion zunächst als Antigen mit einem monoklonalen Primärantikörper (capture antibody), der über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C an eine Mikrotiterplatte (Nunc-Immuno Plate, Nunc) angehaftet wurde. Der Antikörper wurde im Verhältnis 1:250 in 0,1 M Carbonatpuffer (pH 9,5) verdünnt und nach Inkubation sorgfältig mit Waschpuffer von der Mikrotiterplatte heruntergewaschen. Danach erfolgte bei Raumtemperatur eine einstündige Inkubation mit Blockpuffer um freie Proteinbindungsstellen zu blockieren. Zwischen den Arbeitsschritten wurde jeweils drei Mal mit Waschpuffer gewaschen. Nun wurden eine Standardreihe mit rekombinantem Interleukin 8 sowie die Zellüberstände in 1:500 -Verdünnungen auf die ELISA-Platten aufgetragen und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Dem Antigen-Antikörper-Komplex wurde nun ein enzymgekoppelter Sekundärantikörper (detection antibody) hinzugegeben, der ebenfalls mit IL-8 Bindungen eingeht und gleichzeitig eine Farbreaktion katalysiert. Diese Farbreaktion wurde nach 20 Minuten mit einer ELISA-Stopplösung beendet, wobei sich eine Farbänderung von blau nach gelb zeigte.

Die Intensität der Farbreaktion war proportional zu der IL-8-Konzentration und konnte photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt werden. Anhand einer Standardkurve (200-, 100-, 50-, 25-, 12,5-, 6,3- und 3,1pg/ml) wurde die absolute Konzentration ermittelt.

Rekombinanter MCP-1 ELISA

Zur Quantifizierung von MCP-1 wurde ein Rat MCP-1 (Rt MCP-1) ELISA Kit (BioSource, USA) verwendet. Die Kammern der Mikrotiterplatte wurden nach

Herstellerangaben mit 50 µl 8 mM Natriumazidlösung vorbehandelt. Die Kammern zur Standardwertbestimmung wurden mit 100 µl der Standardkonzentrationslösungen (750-, 375-, 187-, 93,7-, 46,9-, 23,4 und 11,7 pg/ml) zusätzlich gefüllt und die zu messenden Probenlösungen im Verhältnis 1:1 mit 50 µl 15 mM Natriumazidlösung vermischt und ebenfalls in die Kammern pipettiert. Das in den Zellkulturüberständen enthaltene MCP-1 reagierte hierbei in einer Antigen-Antikörper-Reaktion zunächst als Antigen mit einem monoklonalen Primäantikörper (capture antibody), welcher schon beschichtet an der vom Hersteller mitgelieferten Mikrotiterplatte vorlag. Die an die bodenständigen Antikörper gebundenen Antigene reagierten in der ersten Phase weiterhin mit dazugegebenen, sich in Lösung befindlichen, Biotin-markierten anti-MCP-1-Antikörpern. Die Platte wurde so 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die ungebundenen Bestandteile viermal sorgfältig mit jeweils 400 µl mitgeliefertem Waschpuffer heruntergewaschen. Die Platte wurde nun für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit Streptavidin-Peroxidase-Lösung inkubiert, welche sich mit den Biotin-markierten anti-MCP-1-Antikörpern verbindet. Danach wurde wieder sorgfältig viermal gewaschen und folgend mit stabilisierter Chromogenlösung für 30 Minuten bei Raumtemperatur und unter Vermeidung von Lichteinfall inkubiert. Der dabei entstehende Farbumschlag konnte photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen werden und war proportional zu der MCP-1-Konzentration. Die absolute Konzentration wurde anhand der Standardwerte berechnet.

2.2.6 Western Blot und Proteinextraktion für säurelösliche Proteine

Histonmodifikationen wurden gemessen, indem die säurelöslichen Proteine durch eine spezielle Extraktion gewonnen und anschließend im Western Blot quantifiziert wurden.

Vorbereitung der Zellen (HUVEC)

Drei Stunden vor Stimulationsbeginn wurden die in 10cm-Schalen kultivierten Endothelzellen vom Kultivierungsmedium in das Stimulationsmedium überführt um etwaige Stimulationen von Kinasen zu minimieren. Zur Gewinnung eines Wertes benötigte man konfluente Zellen einer 10cm-Schale. Zellinhibitoren wurden 1 Stunde vor Stimulationsbeginn dem Stimulationsmedium zugegeben. Oxidiertes LDL wurde in

den verwendeten Konzentrationen unter sterilen Bedingungen hinzu pipettiert.

Lyse der Zellen

Nach zweimaligem Waschen mit eiskaltem Phospho-Proteinwaschpuffer wurden die Zellen in 800µl eiskaltem Lysepuffer abgekratzt und in Eppendorfgefäße (1,5 ml) überführt.

Lyse der Zellkerne

Zur Hydrolyse der Zellkerne wurde H_2SO_4 bis zu einer Endkonzentration von 0,2 M (200 µl Elisa-Stopplösung) zum Zelllysat hinzugefügt, gut gemischt und für 60 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden das Lysat für 10 Minuten bei 4 °C und 24980 x g zentrifugiert, der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß (1,5 ml) überführt und das zurückbleibende Pellet verworfen.

Extraktion der Histone

Zur Extraktion der säurelöslichen Proteine wurde dem Lysat 50%ige Trichloressigsäure bis zu einer Endkonzentration von 20% hinzugefügt (666 µl 50%ige Trichloressigsäure auf 1000 µl Lysat) und das Lysat für 45 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Lysat für 10 Minuten zentrifugiert (4 °C und 24980 x g) und der Überstand verworfen.

Behandlung des Protein-Pellets

Im Eppendorfgefäß verblieben die säurelöslichen Proteine und wurden durch zweimaliges Waschen mit 1ml Aceton als Pellet sichtbar. Dabei wurden die Proteine zwischen den Waschschritten für 1 Minute herunterzentrifugiert (4 °C und 24980 x g) und erneut in Aceton aufgenommen. Schließlich wurde das Pellet in 200µl Phospho-Proteinwaschpuffer gelöst und mit 50 µl Lämmli-Puffer (4x) versetzt. Anschließend erfolgte die Denaturierung der Proteine für 5 Minuten bei 95 °C in einem Heizschüttler (Thermomixer comfort, Eppendorf).

Western Blot

Die Quantifizierung der extrahierten Proteine erfolgte analog zum oben beschriebenen Verfahren (siehe 2.2.3). Da im Falle einer Histonextraktion keine Proteinbestimmung nach Bradford möglich ist, wurden gleiche Volumina der extrahierten Werteproben separat in jeweils eine Geltasche aufgetragen. Die aufzutragende Menge war abhängig vom Protein, das detektiert werden sollte und wurde immer in Vorversuchen ermittelt. Sie lag zwischen 5 µl und 20 µl der Proteinlösung. Für die Auftrennung der Histone wurde ein Gel mit einem 16%igen Akrylamidgehalt gegossen. Zur Größenbestimmung der Proteine wurde ein Marker (Amersham Rainbow high) aufgetragen.

2.2.7 Fluorimetrischer HDAC-Aktivitätsassay

Die globale Aktivität der im Zellkern enthaltenden HDACs wurde mittels fluorimetrischen HDAC-Aktivitätsassay (Biomol, Hamburg) bestimmt. Dabei handelt es sich um ein einfaches Verfahren, bei dem im ersten Schritt die Proteinextrakte mit einem fluoreszierenden Substrat inkubiert werden (HDAC assay substrate), wodurch es zur Deazetylierung desselben kommt. Im zweiten Schritt wird durch die Hinzugabe einer Aktivatorlösung ein Fluorophor aus dem deazetylierten Substrat freigesetzt. Die nach Anregung des Fluorophor mit einer bestimmten Wellenlänge entstehende Photoemission kann spektrometrisch gemessen werden.

Vorbereitung der Zellen (HUVEC)

Vor Stimulationsbeginn wurden die in 10cm-Schalen kultivierten Endothelzellen vom Kultivierungsmedium in das Stimulationsmedium überführt. Zur Gewinnung eines Wertes benötigte man konfluente Zellen einer 10cm-Schale. Zellinhibitoren wurden 1 Stunde vor Stimulationsbeginn dem Stimulationsmedium zugegeben. Oxidiertes LDL wurde in den verwendeten Konzentrationen unter sterilen Bedingungen hinzu pipettiert.

Extraktion der Kernproteinfraktion

Die HDAC-Aktivität sollte nur in der Kernproteinfraktion bestimmt werden. Dazu wurde eine fraktionierte Proteinextraktion durchgeführt. Nach einmaligem Waschen mit eiskaltem PBS -/- wurden die Zellen in 100 µl eiskaltem Lysepuffer A abgekratzt und in

Eppendorfgefäße (1,5 ml) überführt. Anschließend wurden sie 5 Minuten auf Eis inkubiert. Die zytosolische Fraktion wurde im Überstand durch Zentrifugation für 3 min bei 5700 rpm und 4 °C vom Pellet, welches die Kernfraktion enthielt, getrennt. Danach wurde dieses in 50 µl Lysepuffer B resuspendiert und ebenfalls für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Zentrifugieren (4 °C und 24980 x g) trennte die Kernproteine (Überstand) von restlichen zellulären Bestandteilen. Der Proteingehalt der einzelnen Proben wurde nach dem Bradford-Verfahren (siehe 2.2.3) bestimmt. So konnten quantitative Unterschiede in den einzelnen Proben eliminiert werden.

Fluorimetrische Messung der HDAC-Aktivität

Die benötigten Chemikalien und Puffer wurden nach Herstellerangaben verdünnt und zur Nutzung vorbereitet. 10 µl des HDAC Assay Buffer (10 ml mit 25 mM Tris (pH 8,0), 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1 mM MgCl₂) wurden in jede Plattenvertiefung (Well) pipettiert. 15 µl des Proteinextraktes (angepasst nach Proteingehalt und auf 15 µl mit HDAC Assay Buffer ergänzt) oder Standardverdünnung sowie 15 µl HeLa-Kernextrakt (Positivkontrolle) oder 15 µl HDAC Assay Buffer (Negativkontrolle) wurden in die Plattenvertiefungen hinzugegeben. Nachdem die Proben eine Temperatur von 30 °C erreicht hatten, wurden 15 µl „HDAC assay substrate“ hinzupipettiert und gut gemischt. Die Mikrotiterplatte wurde nun für 30 min bei 30 °C inkubiert. Danach wurden 20 µl verdünnter „Aktivatorlösung“ (18.6 µl HDAC Assay Buffer, 1 µl Activator Solution und 0.4 µl 200 µM Trichostatin A) hinzugegeben, wieder gut vermischt und die Platte für weitere 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Eine Standardreihe eines unacetylierten Standards (20-, 10-, 5-, 2,5-, 1,25-, 0,625-, 0,1325- und 0 µM) wurde ebenfalls durch Verdünnung in HDAC Assay Buffer erstellt und ab dem Punkt des Hinzugebens der „Aktivatorlösung“ analog behandelt. Die HDAC-Aktivität konnte nach Inkubation mittels Fluoreszenz Spektrophotometer (FluoroMax-2, ISA SPEX/ Jobin Yvon, Grasbrunn) ermittelt werden. Die Anregung des Fluorophors geschah bei 360 nm Wellenlänge; die Photoemission wurde bei 450 nm Wellenlänge bestimmt. Die HDAC-Aktivität war proportional zur Photoemission und konnte im Vergleich mit der Standardkurve relativ bestimmt werden.

2.2.8 Gewebe- und Immunhistochemie

Gewebeproben von Koronararterien explantierter Herzen wurden retrospektiv zur Analyse verwendet. Insgesamt wurden Proben von fünf Patienten, bei denen eine Herztransplantation durchgeführt worden war, entnommen. Die Nutzung der Gewebeproben zu wissenschaftlichen Zwecken wurde von der Ethikkommission der Charité - Universitätsmedizin Berlin gestattet. Die Gewebeproben, entnommen aus dem Ramus interventricularis anterior der linken Koronararterie, beinhalteten jeweils mehrere arterielle Gefäßaufteilungen. Sie wurden in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Es erfolgte danach mit Hilfe eines Mikrotoms sofort die Anfertigung von 5 µm dicken Schnitten. Nach etwa 12 - 24 Stunden Lufttrocknung bei Raumtemperatur war die Weiterverarbeitung möglich. Die Analyse der Lokalisation und des Grades der atherosklerotischen Gefäßveränderungen erfolgte mittels standardisierter Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung). Zur immunhistochemischen Messung der HDACs, wurden verdünnte HDAC1-Antikörperlösungen (Abcam, Cambridge, UK) im Verhältnis 1:11 und verdünnte HDAC2-Antikörperlösungen (Abcam, Cambridge, UK) im Verhältnis 1:5000 verwendet. Vor dem Färbevorgang ist die vollständige Entfernung des Paraffins zur Vermeidung von Hintergrundfärbung ein entscheidender Schritt (Boenisch, 2003). Es erfolgte die Entparaffinierung mittels Xylol und Ethanol. Zur Antigendetektion und zur Verbesserung und Optimierung der Färbeergebnisse wurden die vom Paraffin befreiten Gewebeschnitte in Natriumzitatpuffer (pH 6,0) eingebracht und für fünf Minuten gekocht. Nach mehrmaligen Waschgängen mit Tris-Puffer (6,1 g Tris in 50 ml Aqua dest. lösen und 37 ml 1 N (HCl) hinzufügen. Aqua dest. ad 1 l. pH-Wert 7,6 bei 25 °C) wurden die Schnitte für fünf Minuten mit Blockpuffer behandelt (DAKO, Glostrup, Denmark). Danach erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper in einer speziellen Verdünnungslösung (Zymed, San Francisco, CA, USA) für 20 Minuten bei Raumtemperatur und danach bei 4 °C über Nacht. Nach wiederholtem Waschen mit Tris-Puffer konnte der gebundene Antikörper mittels eines Streptavidin-Biotin/Alkali-Phosphatase-Systems (BioGenex, San Ramon, CA, USA) nach einem Standardprotokoll gemäß Herstellerangaben bestimmt werden. Zur Visualisierung wurde ein Fast-red-Substrat-System (Sigma, Deisenhofen, Germany) benutzt. Am Ende wurden die Gewebeschnitte mit Aquatex (Merck, Gernsheim, Germany) und entsprechenden Deckgläschen eingedeckt.

Quantitative Analyse der Immunfärbung

Die Bildanalyse wurde nach einem schon etablierten Verfahren durchgeführt (Ermert et al., 2001). Die Fluoreszenzbilder wurden mit einem motorisierten Axioskop (Axioskop 2 mot, Objektiv: 40x, num. Apertur: 1,3, Zeiss Plan-NeoFluar), welches mit einer gekühlten AxioCam MRm Kamera (Zeiss) ausgestattet ist, in 8-bit Graustufenskalisierung (Wertebereich 0 - 255) aufgenommen. Die Messung erfolgte mit einem spezifischen Filter für das rote Alkali-Phosphatase-System (Wellenlänge 525 nm; halbe Bandbreite 10 nm \pm 2 nm; Chroma Technology Corp., Brattleboro, USA). Die digitale Bildausarbeitung erfolgte über die Software ImageProPlus 4.5 (Media Cybernetics, Silver Springs, USA). Um den Einfluß einer unspezifischen Antikörperbindung zu evaluieren, erfolgte eine Hintergrundmessung. Ein Schwellenwert von 60 Graustufen wurde für eine positive Färbung festgesetzt. Für die Messung der HDAC-Expression wurden Endothelzellen von normalen Gefäßabschnitten mit denen von offenen atherosklerotischen Läsionen desselben Gewebeschnittes verglichen. Mindestens 15 Zellen wurden jeweils für beide Abschnitte analysiert. Die Signalintensität der Kontrollzellen wurde auf 100% festgelegt und eine Veränderung innerhalb der atherosklerotischen Läsion als prozentualer Anteil der Kontrollmessung ausgegeben. Zur direkten Visualisierung der Intensität der Immunfärbung kam eine Fehlfarbenbilddarstellung (Pseudocolor) zur Anwendung. Bilder der HE-gefärbten Präparate wurden mit einer gekühlten AxioCam HRc Kamera (Zeiss) gemacht (Objektiv: 10x, num. Apertur: 0,3, Zeiss Plan-NeoFluar).

2.2.9 Statistische Auswertung

Alle Versuche wurden mindestens dreimal erfolgreich durchgeführt. Die gezeigten Daten sind als Mittelwerte \pm der Standardabweichung von wenigstens drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Für ELISA-Versuche wurde eine 1-Weg-ANOVA (Einwegvarianzanalyse für unverbundene Stichproben) durchgeführt. Die beobachteten Unterschiede zwischen den Proben wurden über den Student-Newman-Keuls Posttest geprüft. Unterschiede wurden ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5% ($p < 0,05$) als signifikant eingestuft und durch ein Sternchen (*) oder Rautezeichen (#) angezeigt.

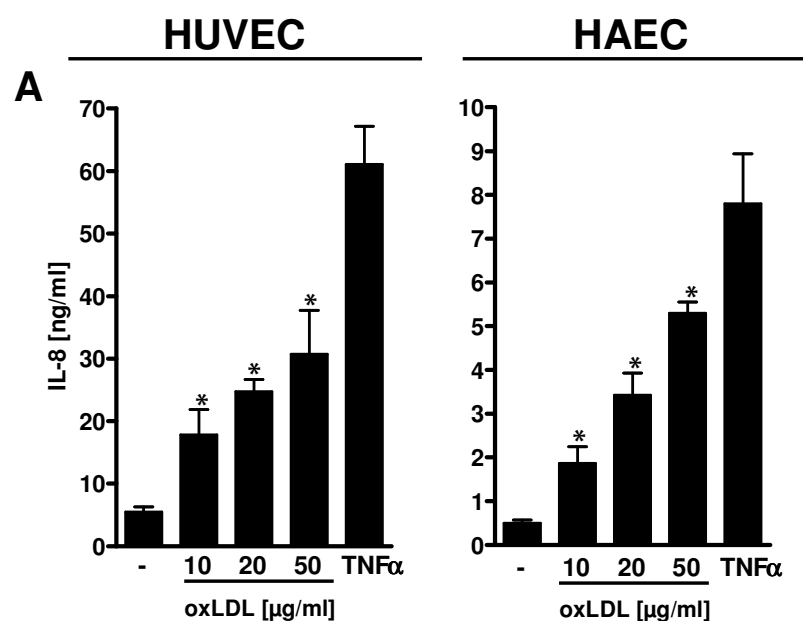
3 Ergebnisse

Oxydierte LDL bewirken die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine aus Endothelzellen. Dies verursacht, unter anderem durch Einwanderung von Leukozyten, eine Entzündung der Gefäßwände, was zur Initiierung und Progression der Atherosklerose beiträgt (Tedgui und Mallat, 2006; Gosling *et al.*, 1999; Gu *et al.*, 1998). In dieser Arbeit wurde die Regulation der Genexpression von IL-8 und MCP-1, zwei wichtigen proatherogenen Zytokinen, durch oxLDL analysiert.

Als Grundlage wurde zunächst die dosisabhängige Bildung von IL-8 und MCP-1 in humanen Endothelzellen geprüft. In humanen venösen (HUVEC) und arteriellen (HAEC) Endothelzellen zeigte sich eine konzentrationsabhängige Steigerung der Zytokinsekretion nach Stimulation mit oxidierten LDL (Abbildung 3.1.1A und 3.1.1B). Die optimalen Konzentrationen von oxLDL wurden in Vorversuchen ermittelt (Daten nicht gezeigt).

3.1 Oxydierte LDL induzieren die Expression von IL-8 und MCP-1 in HUVEC und HAEC

3.1.1 Stimulation von HUVEC und HAEC mit oxLDL induziert die Sekretion von IL-8 und MCP-1.



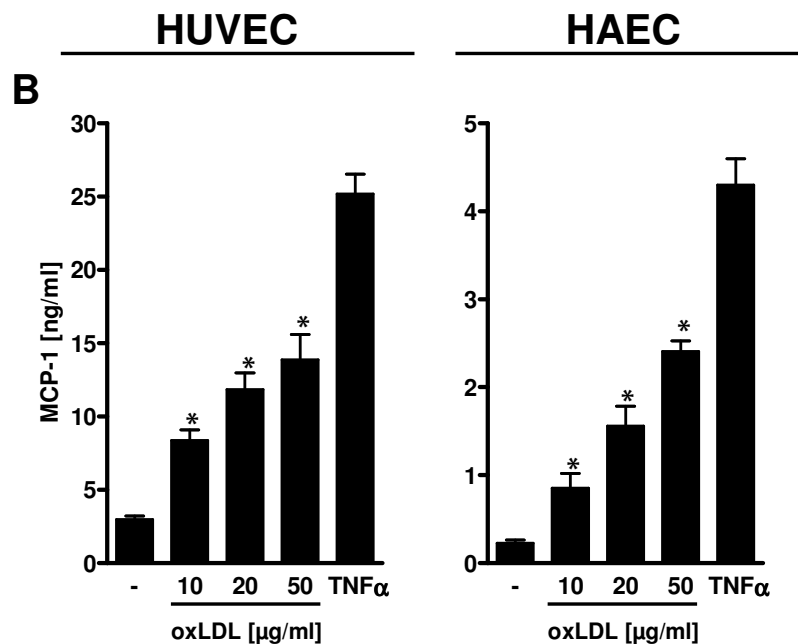


Abbildung 3.1.1: Stimulation von HUVEC und HAEC mit oxLDL induziert die Sekretion von IL-8 und MCP-1

OxLDL induziert konzentrationsabhängig die Freisetzung von IL-8 (A) und MCP-1 (B) in humanen Endothelzellen. HUVEC und HAEC wurden mit oxLDL (10, 20, 50 µg/ml) für 16 h inkubiert. Die Zytokinfreisetzung wurde im Zellüberstand mittels IL-8- und MCP-1-ELISA gemessen. Stimulation der Zellen mit TNF α diente als Positivkontrolle (TNF α). Die gezeigten Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung von wenigstens drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Werte mit $p < 0,05$, die mit einem Sternchen (*) markiert sind, vergleichen Zellen, die mit und ohne (-) oxLDL inkubiert wurden.

Statine haben einen positiven Effekt auf kardiovaskuläre Erkrankungen. Dieser ist neben der Senkung des Serumcholesterins zumindest teilweise auf der Reduktion der Zytokinfreisetzung begründet (Steffens und Mach, 2004; Rosenson, 1999). Daher wurde der Einfluss der Statine auf die Sekretion von IL-8 und MCP-1 aus Endothelzellen in dieser Arbeit eingehender untersucht. Es wurde geprüft, ob Simvastatin in humanen Endothelzellen zu einer Reduktion der Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IL-8 und MCP-1 führt. Abbildung 3.1.2A und 3.1.2B zeigen die Beeinflussung der Freisetzung von IL-8 und MCP-1 durch Simvastatin. Die Versuche wurden sowohl mit venösen als auch arteriellen kultivierten Endothelzellen durchgeführt.

3.1.2 Simvastatin reduziert die Freisetzung von IL-8 und MCP-1 aus HUVEC und HAEC

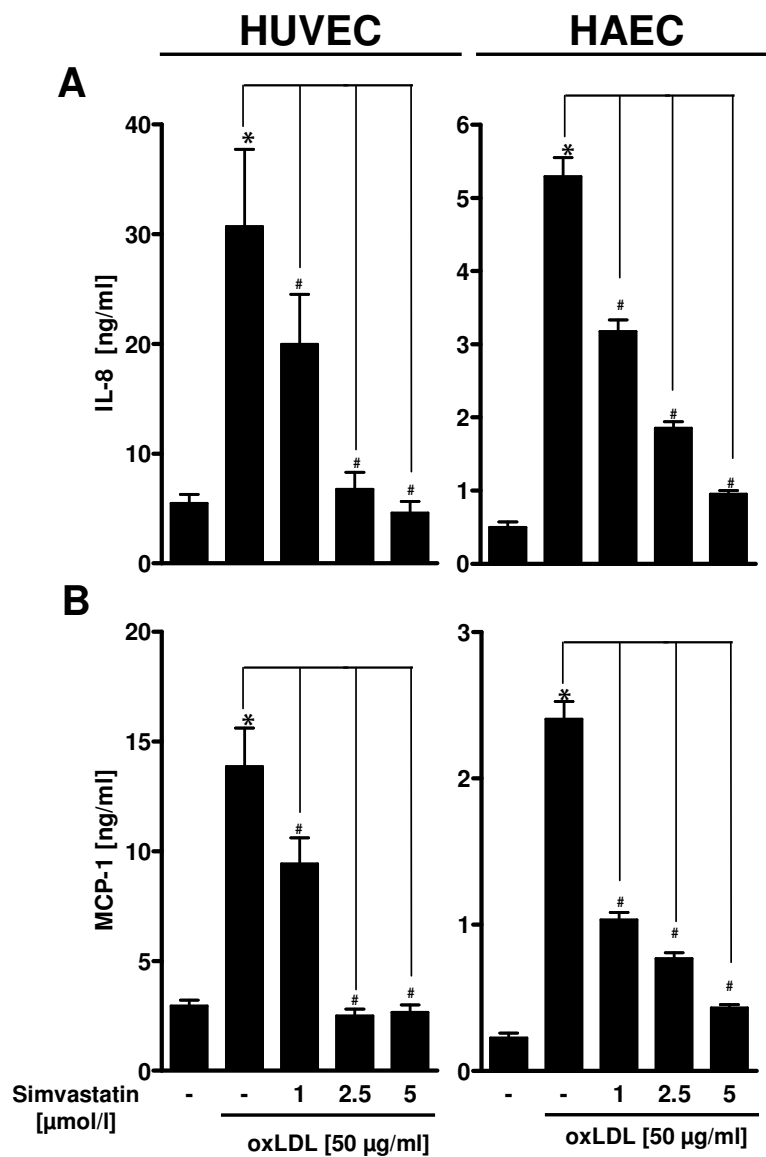


Abbildung 3.1.2: Simvastatin reduziert die Freisetzung von IL-8 und MCP-1 aus HUVEC und HAEC

Simvastatin reduzierte konzentrationsabhängig (1-, 2,5- und 5 μmol/l) die Freisetzung von IL-8 (A) und MCP-1 (B) in humanen Endothelzellen. HUVEC und HAEC wurden 60 min mit Simvastatin inkubiert, danach erfolgte zusätzlich die Stimulation mit oxLDL (50 μg/ml) für 16 h. Die Zytokinfreisetzung wurde im Zellüberstand mittels IL-8- und MCP-1-ELISA gemessen. Die gezeigten Daten sind als Mittelwerte ± Standardabweichung von wenigstens drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Ein Wert mit $p < 0,05$, verglichen mit unstimulierten Zellen, wird dargestellt durch ein Sternchen (*); ein Wert mit $p < 0,05$, verglichen mit oxLDL-stimulierten Zellen ohne Simvastatin, wird dargestellt durch ein Rautenzeichen (#). TNF α diente als Stimulus zur Positivkontrolle (TNF α) und wurde 16 h inkubiert. Die basale Sekretion wurde durch eine unter gleichen Bedingungen inkubierte unstimulierte Probe (-) ermittelt.

Simvastatin inhibierte konzentrationsabhängig die oxLDL-induzierte Freisetzung von IL-8 und MCP-1 aus HUVEC und HAEC. Die optimalen Konzentrationen von Simvastatin und optimalen Stimulationszeitpunkte wurden in Vorversuchen ermittelt (Daten nicht gezeigt).

3.2 Histonmodifikationen tragen zur oxLDL-vermittelten Zytokinexpression in humanen Endothelzellen bei

3.2.1 Oxidierte LDL induzieren globale Histonmodifikationen in HUVEC

Nachdem gezeigt werden konnte, dass oxidierte LDL die Produktion inflammatorischer Zytokine in humanen Endothelzellen induzieren, wurde nun überprüft, inwieweit Histonmodifikationen eine Rolle bei der inflammatorischen Aktivierung von humanen Endothelzellen spielen. Zuerst wurde der Einfluß auf globale intrazelluläre Histonmodifikationen ermittelt (Abbildung 3.2.1).

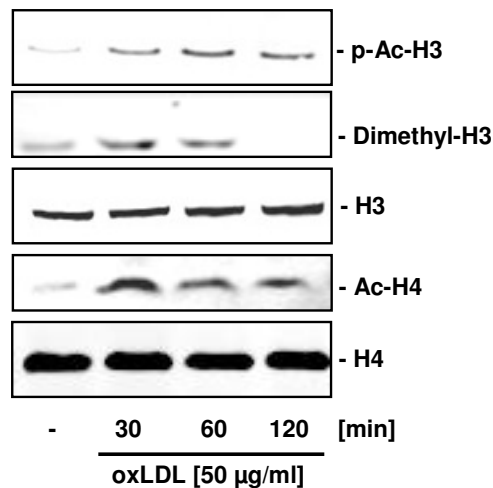


Abbildung 3.2.1: Oxidierte LDL induzieren globale Histonmodifikationen in HUVEC

OxLDL induzierten Phosphorylierung/ Acetylierung (p-Ac-H3) und Methylierung (Dimethyl-H3) von Histone H3 und Acetylierung von Histone H4 (Ac-H4). Die HUVECs wurden mit oxLDL (50 µg/ml) für die angegebenen Zeiten inkubiert. Histone Modifikationen wurden im Western Blot gemessen, indem Antikörper benutzt wurden, die spezifisch acetyliertes Histone H4, phosphoryliertes/ acetyliertes (Ser-10/Lys-14) oder dimethyliertes (Lys-4) Histone H3 detektieren. Die gezeigten Daten sind repräsentative Abbildungen von wenigstens drei unabhängigen Experimenten. Gleiche Quantität der Proteinfractionen wurde durch die Gesamtmenge an Histone H3 (H3) oder Histone H4 (H4) ermittelt.

Es gelang nachzuweisen, dass die Aktivierung der Endothelzellen durch oxidierte LDL eine Änderung des globalen Acetylierungsgrades von H4 bewirkt. Eine Acetylierung des Serinrestes 10 und Phosphorylierung des Lysinrestes 14 der aminoterminalen Enden des Histon H3 konnte ebenfalls im Western Blot detektiert werden. Weiterhin wurden Histonmodifikationen des Histon H3 beobachtet. 30 bis 60 Minuten nach Exposition mit oxidierten LDL kam es zu einer transienten Dimethylierung am Lysinrest 4. Dies zeigt, dass oxidierte LDL in Endothelzellen globale Histonmodifikationen induzieren und weist darauf hin, dass eine Beeinflussung der Histone an der oxLDL-induzierten endothelialen Inflammation beteiligt ist.

3.2.2 TSA verstärkt die oxLDL-vermittelte Expression von IL-8 und MCP-1 in HUVEC und HAEC

Da globale Histonmodifikationen durch oxidierte LDL induziert werden konnten, sollte die besondere Stellung der acetylierenden Modifikationen für die Zytokinexpression in humanen Endothelzellen aufgezeigt werden. Um deren funktionelle Bedeutung zu untersuchen und den Stellenwert der Histon-Deacetylasen zu prüfen, wurde die durch oxidierte LDL stimulierte zelluläre Sekretion von IL-8 und MCP-1 aus HUVEC und HAEC nach Inhibition der Histon-Deacetylasen mittels Trichostatin A ermittelt. (Abbildung 3.2.2A und 3.2.2B).

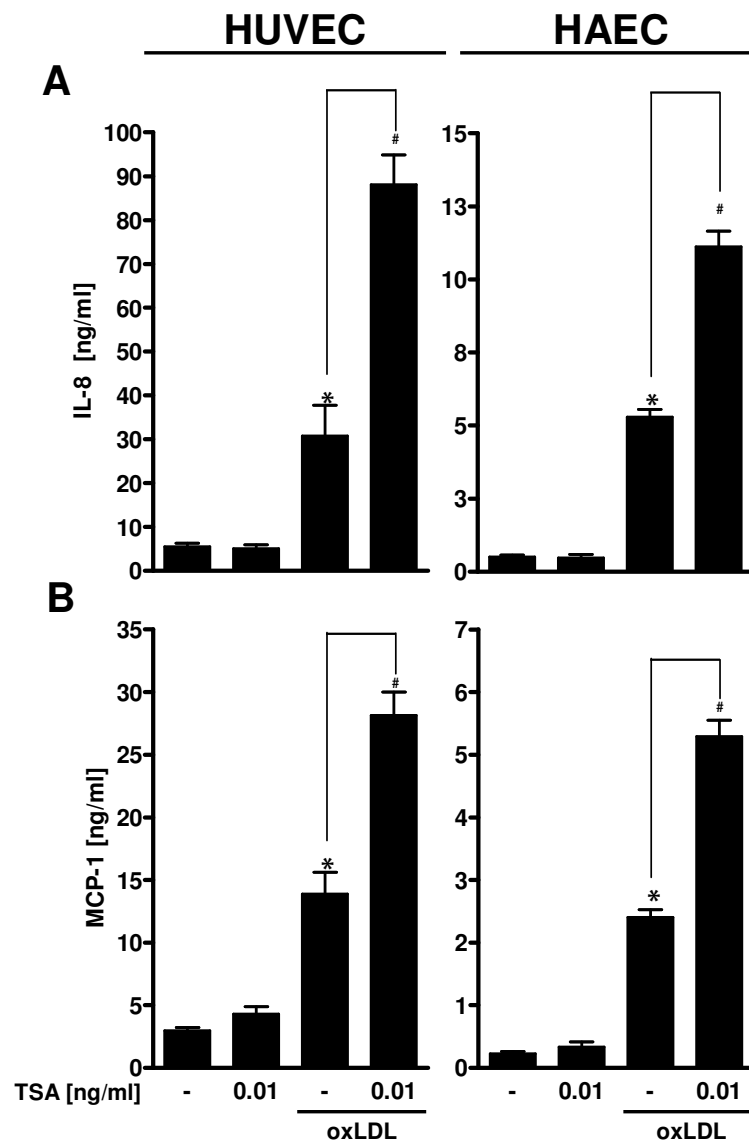


Abbildung 3.2.2: TSA verstärkt die oxLDL-vermittelte Expression von IL-8 und MCP-1 in HUVEC und HAEC

Inhibition der HDACs verstärkte synergistisch die oxLDL-vermittelte Freisetzung von IL-8 (A) und MCP-1 (B) aus humanen Endothelzellen. HUVEC und HAEC wurden 60 min mit TSA (0,01 ng/ml) vorinkubiert, danach erfolgte zusätzlich die Stimulation mit oxLDL (50 µg/ml) für 16 h. Die Zytokinsekretion wurde im Zellüberstand mittels IL-8- und MCP-1-ELISA gemessen. Die gezeigten Daten sind als Mittelwerte ± Standardabweichung von wenigstens drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Ein Wert, dargestellt durch ein Sternchen (*), zeigt signifikante ($p < 0,05$) Unterschiede zwischen mit oxLDL stimulierter und unstimulierter Probe ohne vorherige Inkubation mit TSA (-). Ein Rautenzeichen (#) zeigt signifikante ($p < 0,05$) Unterschiede zwischen mit oxLDL stimulierter und unstimulierter Probe, welche mit TSA präinkubiert wurden.

Die Inhibition der Histon-deacetylierenden Enzyme durch Trichostatin A verstärkte die Sekretion von IL-8 und MCP-1 aus humanen, oxLDL-stimulierten Endothelzellen. Im Falle einer nicht durch TSA beeinflussten Aktivität der Histon-Deacetylasen zeigte sich

im verwendeten Zellmodell eine relative Abnahme der oxLDL-induzierten Genexpression von IL-8 und MCP-1. Eine Inhibition der Histon-Deacetylasen bewirkte dann die Verstärkung der Zytokinausschüttung. TSA induzierte in einer Konzentration von 0,01 ng/ml per se keine signifikante Zytokinexpression in humanen Endothelzellen.

3.3 Oxidierte LDL bewirken Modifikationen am *il8*- und *mcp1*-Genpromotor

Nachdem festgestellt worden war, dass globale Histonmodifikationen durch oxidierte LDL wesentlich beeinflusst werden, sollte die Analyse des *il8*- und *mcp1*-Genpromotors mittels Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) Aufschluß über spezifische Histonmodifikationen geben um die oxLDL-vermittelte Zytokinregulation genauer beurteilen zu können (Abbildung 3.3).

Stimulation der Endothelzellen mit oxLDL induzierte dabei eine schnelle Acetylierung von Histon H4, Acetylierung des Serinrestes 10 und Phosphorylierung des Lysinrestes 14 des Histon H3 und eine Methylierung des Lysinrestes 4 des Histon H3.

Da der Acetylierungsgrad eine besondere Bedeutung bei der inflammatorischen Aktivierung zu haben scheint, wurden die Bindungsmuster von HDACs und HATs betrachtet. Untersucht wurden HDAC1 und HDAC2 sowie der HAT-Komplex CBP/p300 am *il8* und *mcp1* Promotor. Hier zeigten sich eine verminderte Bindung von HDAC1 und HDAC2 sowie die Rekrutierung des CBP/p300-Komplexes an beiden Genpromotoren.

Die Aktivierung der Untereinheit p65 (RelA) des NF- κ B wird als essentiell sowohl für die IL-8 und MCP-1-Expression als auch für die Rekrutierung des Transkriptionsapparates, welcher unter anderem die RNA-Polymerase II (Pol II) beinhaltet, angesehen (Liu und Malik, 2006; Hoffmann *et al.*, 2002). Stimulation mit oxidierten LDL bewirkte an beiden Genpromotoren die Bindung von RelA (p65) und POL II, was auf den Beginn der Transkription hinweist.

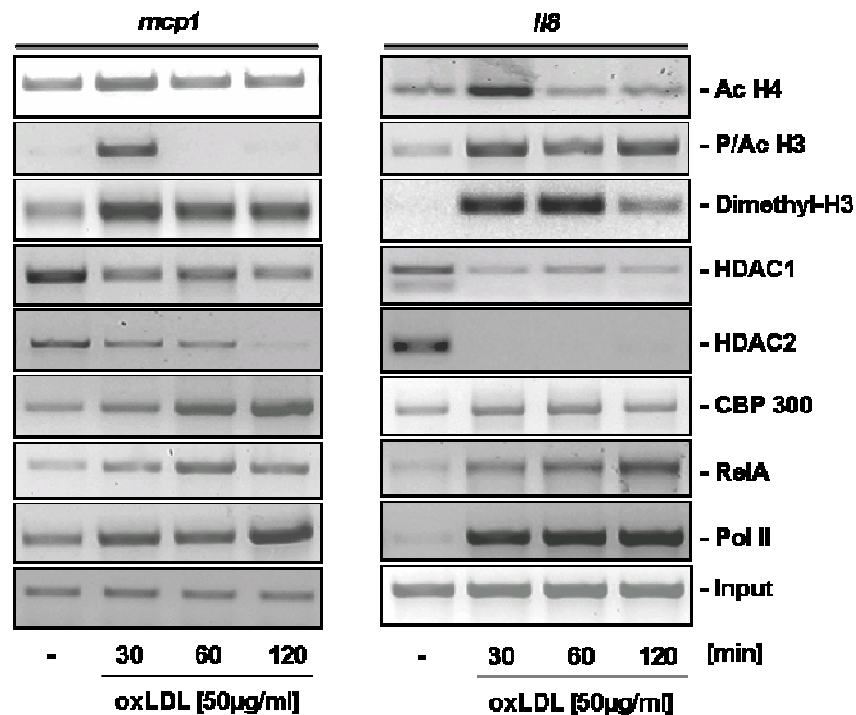


Abbildung 3.3: Oxidierte LDL bewirken Modifikationen am *il8*- und *mcp1*-Genpromotor

OxLDL induzierte Phosphorylierung/Acetylierung (p-Ac-H3) und Dimethylierung (Dimethyl-H3) von Histon H3, Acetylierung von Histon H4 (Ac-H4), Rekrutierung von CBP/p300 (CBP 300), p65 (RelA) und RNA-Polymerase II (Pol II) am *il8* und *mcp1* Promotor, wohingegen die Bindung von HDAC1 und HDAC2 reduziert wurde. Die HUVECs wurden mit oxLDL (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) für die angegebenen Zeiten inkubiert. Die Bindung der modifizierten Histone (acetyliertes Histon H4, phosphoryliertes/acetyliertes (Ser-10/Lys-14) oder dimethyliertes (Lys-4) Histon H3) sowie HDAC1, HDAC2, CBP/p300, Pol II und NF- κB /RelA wurden mittels ChIP am *il8* und *mcp1* Promotor detektiert. Die gezeigten Daten sind repräsentative Abbildungen von wenigstens drei unabhängigen Experimenten. Gleiche Proteinfractionen wurden durch Kontrollen quantifiziert (Input).

3.4 Simvastatin inhibiert oxLDL-vermittelte Histonmodifikationen

Wie zuvor dargestellt, verhinderte Simvastatin die IL-8- und MCP-1-Expression aus humanen Endothelzellen, nachdem diese durch oxidierte LDL stimuliert worden waren (Abbildung 3.1.2A und 3.1.2B). Da oxidierte LDL Histonmodifikationen auf Promotorebene beeinflussen, wurde nun auch der Effekt von Simvastatin auf Histonmodifikationen an den Genpromotoren *il8* und *mcp1* geprüft (Abbildung 3.4).

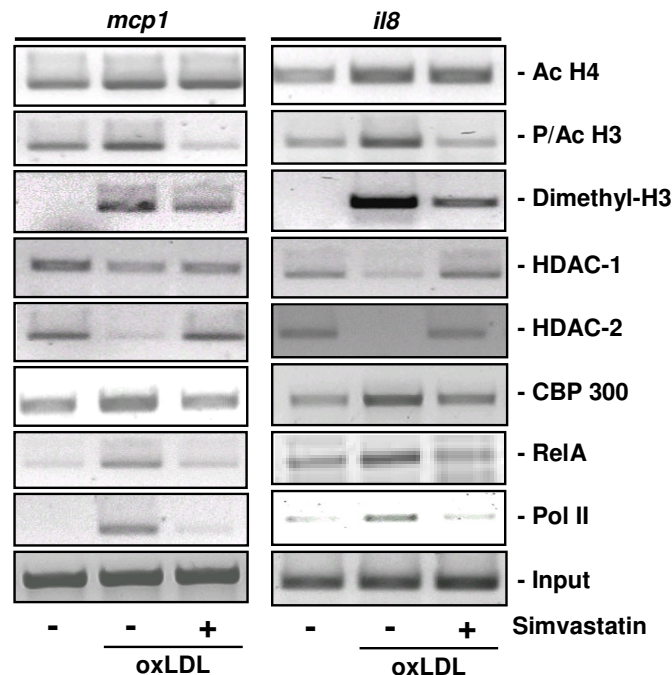


Abbildung 3.4: Simvastatin inhibiert oxLDL-vermittelte Histonmodifikationen

Simvastatin blockierte am *il8*- und *mcp1*-Promotor die oxLDL-vermittelte Bindung der modifizierten Histone (phosphoryliertes/acetyliertes (Ser-10/Lys-14) und dimethyliertes (Lys-4) Histon H3), CBP/p300, Pol II und NFκB/RelA, jedoch nicht die des acetylierten Histon H4. Die HUVECs wurden für 60 min mit Simvastatin inkubiert und anschließend mit oxLDL (50 µg/ml) für 30 min, ausgenommen CBP/p300 und NFκB/RelA (60 min), stimuliert. Das Bindungsverhalten am *il8* und *mcp1* Promotor wurde mittels ChIP analysiert. In den mit Simvastatin behandelten Zellen konnte eine inhibierte Rekrutierung von phosphoryliertem/acetyliertem (Ser-10/Lys-14) und dimethyliertem (Lys-4) Histon H3, CBP/p300, NFκB/RelA und Pol II, nicht jedoch acetyliertem Histon H4 beobachtet werden. Weiterhin intensivierte Simvastatin die Bindung von HDAC1 und HDAC2 an beiden Promotoren. Die gezeigten Daten sind repräsentative Abbildungen von wenigstens drei unabhängigen Experimenten. Gleiche Proteinfractionen wurden durch Kontrollen quantifiziert (Input).

Simvastatin reduzierte nach Vorinkubation in einer Konzentration von 5 µmol/l die Phosphorylierung, Acetylierung und Dimethylierung von Histon H3 des *il8*- und *mcp1*-Genpromotors. Jedoch zeigte sich kein Effekt auf die Acetylierung von Histon H4. Weiterhin bewirkte Simvastatin in oxLDL-exponierten Endothelzellen eine Modifikation der Enzymbindung an beiden Genpromotoren, welche die DNA in einen inaktiveren, nicht der Transkription unterworfenen Zustand versetzen. So waren eine reduzierte Rekrutierung der HAT CBP/p300 sowie eine verstärkte Promotorbindung der Histon-Deacetylasen HDAC1 und HDAC2, welche die Acetylierung supprimieren, festzustellen. Zusätzlich kam es durch Simvastatin zu einer verminderten Bindung von NF-κB p65 und der RNA-Polymerase II, was auf eine erniedrigte Transkriptionsaktivität hinweist.

3.5 Oxidierte LDL beeinflussen die Expression von HDAC1 und HDAC2 und die globale Aktivität der HDACs in Endothelzellen

3.5.1 Oxidierte LDL vermindern die Expression von HDAC1 und HDAC2

Die bisher erhobenen Ergebnisse weisen darauf hin, dass Histon-Acetylierungen wesentlich zur proinflammatorischen Genexpression durch oxidierte LDL in humanen Endothelzellen beitragen. In chronisch-entzündlich verändertem Lungengewebe tragen verminderte Expression und Aktivität von HDACs zu einer vermehrten Transkription inflammatorischer Gene bei (Adcock *et al.*, 2004; Cosio *et al.*, 2004). Da die Atherosklerose ebenfalls als ein chronischer Entzündungsprozess der Gefäßwände anzusehen ist, wurde der langzeitige Einfluss von oxidierten LDL auf die Regulation der HDACs in Endothelzellen näher untersucht. Eine dauerhafte Inkubation von Endothelzellen mit oxidierten LDL (50 µg/ml) über 16 Stunden verringerte die Proteinexpression von HDAC1 und HDAC2 (Abbildung 3.5.1).

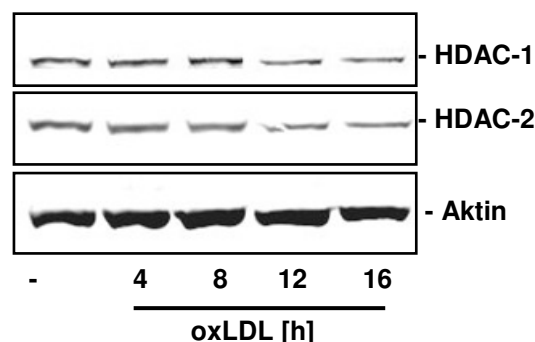


Abbildung 3.5.1: Oxidierte LDL vermindern die Expression von HDAC1 und HDAC2

Expression der HDAC1 und HDAC2 in Endothelzellen *in vitro*. Die HUVECs wurden mit oxLDL (50 µg/ml) für die angegebenen Zeiträume stimuliert. Die Expression von HDAC1 und HDAC2 wurde im Western Blot gemessen. Die gezeigten Daten sind repräsentative Abbildungen von wenigstens drei unabhängigen Experimenten. Gleiche Quantität an Gesamtprotein wurde durch Anti-Aktin-Antikörper (Aktin) überprüft.

3.5.2 Oxidierte LDL und Simvastatin modulieren die globale Aktivität der HDACs

Da die Abnahme der Gesamtproteinmenge an HDACs noch keinen genauen Aufschluss über die tatsächliche Aktivität dieser Enzyme aufzeigt, wurde die globale HDAC-Aktivität gemessen um die funktionelle Bedeutung der reduzierten HDAC-Expression zu prüfen. Es zeigte sich eine verminderte globale Aktivität der HDACs nach

Exposition mit oxidierten LDL (Abbildung 3.5.2A).

Auf Promotorebene wurde im Rahmen dieser Arbeit bereits festgestellt, dass Simvastatin einen Einfluss auf die HDAC1 und HDAC2 ausübt. Inwiefern Simvastatin mit der globalen HDAC-Aktivität interagiert, sollte in diesem Zusammenhang ebenfalls genauer überprüft werden. Es stellte sich heraus, dass Simvastatin, zumindest teilweise, die durch oxidierte LDL vermittelte Reduktion der HDAC-Aktivität in humanen Endothelzellen umzukehren vermag (Abbildung 3.5.2B).

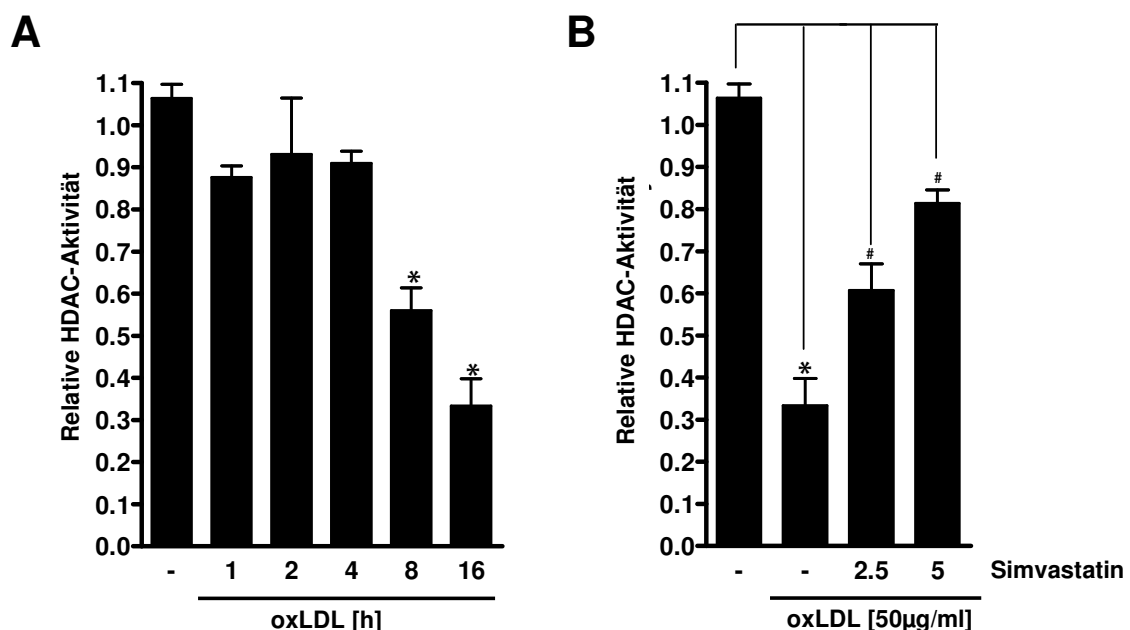


Abbildung 3.5.2: OxLDL und Simvastatin modulieren die globale Aktivität der HDACs

OxLDL vermindern die globale HDAC-Aktivität (A). Die HUVECs wurden für die angegebenen Zeiträume mit oxLDL (50 µg/ml) inkubiert. Die globale HDAC-Aktivität wurde im HDAC Aktivitätsassay quantifiziert. Simvastatin inhibierte die durch oxLDL-vermittelte Abnahme der HDAC-Aktivität (B). Die HUVECs wurden mit Simvastatin (2,5 und 5 µmol/l) 60 min präinkubiert und dann für 16 h mit oxLDL (50 µg/ml) stimuliert. Ein Wert, dargestellt durch ein Sternchen (*), zeigt signifikante ($p < 0,05$) Unterschiede zwischen mit oxLDL-stimulierter und unstimulierter Probe (-). Ein Rautenzeichen (#) zeigt signifikante ($p < 0,05$) Unterschiede zwischen oxLDL-stimulierter und mit Simvastatin präinkubierter Probe. Die gezeigten Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung von wenigstens drei unabhängigen Experimenten dargestellt.

3.5.3 Die Expression von HDAC2 ist in Endothelzellen atherosklerotisch veränderter Koronarien *in situ* vermindert

Im Rahmen der bislang durchgeführten Versuche zeigte sich unter der oxLDL-induzierten Inflammation in humanen Endothelzellen eine Abnahme der HDAC-Expression und -Aktivität *in vitro*. Um die Bedeutung dieses Vorgangs im Kontext der endothelialen atherosklerotischen Entzündung zu unterstreichen, wurde die Proteinexpression der HDAC1 und HDAC2 im Endothel humaner Koronararterien *in situ* analysiert (Abbildung 3.5.3). Abbildung 3.5.3A I und II zeigt die histologischen Gewebeschnitte in Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung). Abbildung A II repräsentiert dabei ein atherosklerotisch verändertes Gefäß, Abbildung A I zeigt einen diesbezüglich unveränderten normalen Befund.

Abschnitte präparierter Koronargefäße ohne atherosklerotische Läsionen wiesen eine konstitutive Expression beider HDACs in den Kernen der Endothelzellen auf (Abbildung 3.5.3A III, IV). In Endothelzellen atherosklerotischer Koronarläsionen kam eine leichte Reduktion der HDAC2-Expression zur Darstellung (Abbildung 3.5.3A VI und 3.5.3B H), wohingegen jedoch keine Unterschiede in der Expression der HDAC1 gemessen werden konnten (Abbildung 3.5.3A IV und 3.5.3B G).

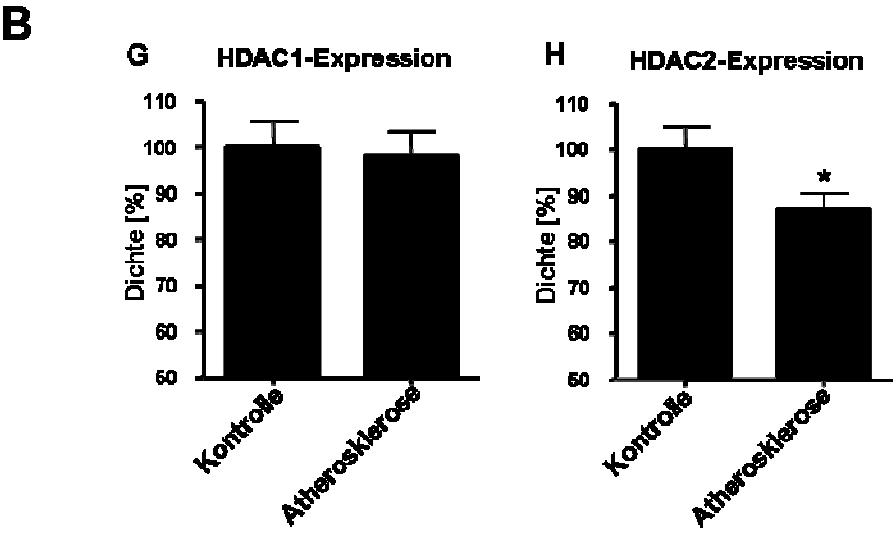
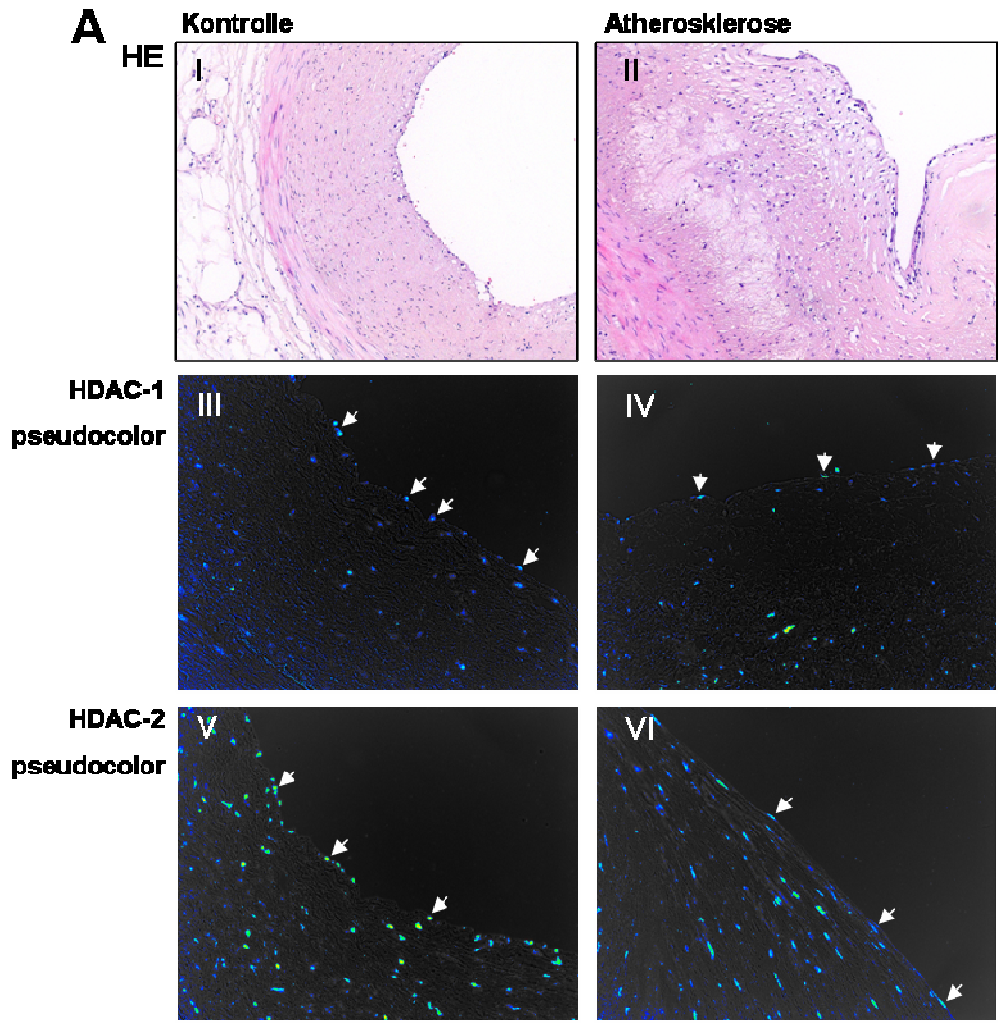


Abbildung 3.5.3: Die Expression von HDAC2 ist in Endothelzellen atherosklerotisch veränderter Koronarien *in situ* vermindert

Koronararterien von fünf Patienten wurden hinsichtlich atherosklerotischer Läsionen untersucht (A). Gezeigt sind jeweils atherosklerotisch und nicht-atherosklerotisch veränderte Gefäßschnitte in Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung (I, II). Die quantitative endotheliale HDAC1- (III, IV) und HDAC2- (V, VI) Expression wurde mittels Immunfluoreszenz digital analysiert. Eine Falschfarbendarstellung (pseudocolor) der nukleären Expression beider Isoformen wurde aufbereitet (Pfeile). Die Expression der HDACs ist dargestellt als prozentualer Anteil der Graustufenwerte, verglichen mit den Kontrollfärbungen, deren Graustufenwerte mit 100% festgelegt wurden (B). Die HDAC2-Expression war signifikant reduziert in den atherosklerotisch veränderten Gefäßabschnitten (A VI und B). Ein Wert, dargestellt durch ein Sternchen (*), zeigt signifikante ($p < 0,05$) Unterschiede zwischen beiden Proben. Die gezeigten Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung von wenigstens fünf unabhängigen Experimenten dargestellt.

4 Diskussion

4.1 Induktion der IL-8- und MCP-1 Expression nach Stimulation mit oxLDL

Endothelzellen haben eine herausragende Bedeutung für alle mit dem Gefäßsystem assoziierten Funktionen (Esper *et al.*, 2006). Eine gestörte endotheliale Funktion wird mit einer Vielzahl von pathologischen Zuständen der Gefäßwände wie arterieller Hypertension und Atherosklerose in Verbindung gebracht (Brunner *et al.*, 2005). Das Endothel selbst gilt als primärer Angriffspunkt bei etlichen inflammatorischen Erkrankungen (Wagner und Frenette, 2008; Hippenstiel und Suttrop, 2003; Prasad *et al.*, 2002; Sullivan *et al.*, 2000). Es wurde gezeigt, dass die Akkumulation von oxidierten LDL innerhalb der Gefäßwände eine Inflammation des Endothels auslöst und die Entstehung der Atherosklerose begünstigt (Tedgui und Mallat, 2006; Davignon und Ganz, 2004). In der vorliegenden Arbeit induzierte die Inkubation von Endothelzellen mit oxidierten LDL die Freisetzung der chemotaktischen und proinflammatorischen Zytokine IL-8 und MCP-1. Diesen beiden Botenstoffen wird eine wichtige Rolle innerhalb der Pathogenese der Atherosklerose zugeschrieben: So konnte in atherosklerotisch veränderten Aortenbögen von Mäusen eine Verbindung zwischen der Expression von MCP-1 und Progression von atherosklerotischen Plaques nachgewiesen werden (Lutgens *et al.*, 2005). Ebenfalls zeigte sich im Blutserum von Patienten, die an koronarer Herzkrankheit, Myokardinfarkt oder instabiler Angina pectoris litten, eine erhöhte Konzentration von MCP-1 (Tucci *et al.*, 2006; Ikeda, 2003; Ikeda *et al.*, 2002). Die Bedeutung von oxLDL für die Entstehung der Atherosklerose wurde erst jüngst durch Ishigaki *et al.* aufgezeigt. Im Tiermodell kam es nach selektiver Plasmareduktion von oxLDL - bei unbeeinflusstem Gesamtcholesterin – zur fast vollständigen Hemmung der Progression der Atherosklerose und unter anderem zur Verminderung der Plasmaspiegel von MCP-1 in den Versuchstieren (Ishigaki *et al.*, 2008).

Neben MCP-1 gilt auch IL-8 als wichtiger Faktor. Erhöhte Blutspiegel dieses Zytokins wurden bei Patienten mit bestehender koronarer Herzkrankheit gemessen (Ikeda *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2001). Aortenaneurysmen sind wesentlich durch Atherosklerose mitverursacht und entsprechen einer späten Stufe der atherosklerotischen Inflammation. In Gewebeproben abdomineller Aortenaneurysmen konnte eine

gesteigerte IL-8-Expression nachgewiesen werden (Koch *et al.*, 1993). In Proben aus Thrombenmaterial und atherosklerotischen Plaques, welche aus Koronarien von Patienten mit akutem Myokardinfarkt mittels transluminaler Kathetertechnik gewonnen wurden, wurde eine signifikante Erhöhung von IL-8 ermittelt (Simonini *et al.*, 2000). Da die Freisetzung von IL-8 und MCP-1 in vergangenen Arbeiten auch aus Makrophagen, die mit oxidierten LDL inkubiert wurden, beobachtet werden konnte (Wang *et al.*, 1997; Apostolopoulos *et al.*, 1996) und diesen Molekülen eine entscheidende Rolle in der Wirtsantwort auf inflammatorische Prozesse innerhalb der Gefäßwände zukommt (Tedgui und Mallat, 2006), sind sie in der vorliegenden Arbeit als wichtige Modellzytokine analysiert worden. Es gelang der Nachweis, dass IL-8 und MCP-1 auch in venösen (HUVEC) und aortalen (HAEC) Endothelzellen durch oxidierte LDL induziert werden.

4.2 Oxidierte LDL induzieren Histonmodifikationen

Die Genexpression in eukaryotischen Zellen wird durch Histonmodifikationen kontrolliert, indem diese die Bindung von Transkriptionsfaktoren, die Rekrutierung des basalen Transkriptionsapparates und die Aktivierung von Promotoren beeinflussen (Nightingale *et al.*, 2006; Schmeck *et al.*, 2005; Turner, 2002; Jenuwein und Allis, 2001; Cheung *et al.*, 2000a). Diese Modifikationen sind notwendig, da eine enge Umwicklung der Kernhistone durch die DNA die Bindung des Transkriptionsapparates und dadurch die Genexpression verhindert (Wu, 1997). Acetylierungen, Phosphorylierungen und Methylierungen können die Polarität der aminoterminalen Histonenden beeinflussen und so zur Änderung der Konformation der DNA-Struktur beitragen (Nightingale *et al.*, 2006; Cheung *et al.*, 2000a). Im Besonderen bewirkt die Histon-Acetylierung eine Lockerung der DNA-Histon-Interaktion und ermöglicht die Bindung von Transkriptionsfaktoren und des basalen Transkriptionsapparates, wodurch die Gentranskription initiiert wird (Nightingale *et al.*, 2006; Agalioti *et al.*, 2002). Unklar ist jedoch, inwieweit oxidierte LDL epigenetische Modifikationen induzieren und in welchem Maß Histonmodifikationen für die Regulation endothelialer atherosklerotischer Inflammation mitverantwortlich sind.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass oxidierte LDL die Pan-

Acetylierung von Histon H4 und die Phosphorylierung (Ser-10), Acetylierung (Lys-14) und Dimethylierung (Lys-4) von Histon H3 bewirken. In Einklang mit diesen Ergebnissen wurde die Phosphorylierung von Serin 10 des Histon H3 mit der Promotor-Aktivierung von *intermediate-early response* Genen in Verbindung gebracht (Crosio *et al.*, 2003; Sacconi *et al.*, 2002). Auch gibt es vermehrt Hinweise, dass die Phosphorylierung von Serinrest 10 des Histons H3 eine Rolle in der Regulation der Transkription spielt, indem sie als Signalmodifikation für subsequente Acetylierung von Lysinresten, im Speziellen des Lysinrest 14 am Histon H3, dient (Cheung *et al.*, 2000a; Barratt *et al.*, 1994). Dies wurde durch Nachweis der erhöhten Affinität für Acetyltransferasen wie Gcn5 zum phosphorylierten Histon H3 unterstrichen (Lo *et al.*, 2000). Agalioti *et al.* zeigten auf, dass sowohl eine Phosphorylierung des Serinrest 10 und Acetylierung des Lysin 14 am Histon H3 als auch eine Acetylierung des Lysin 8 am Histon H4 nötig sind um Transkriptionsfaktoren zu rekrutieren und somit die Gentranskription zu initiieren (Agalioti *et al.*, 2002). Auch in dieser Arbeit fanden sich entsprechende Modifikationen dieser Histone. In Übereinstimmung mit diesen Erkenntnissen wurde bewiesen, dass Histon-Acetylierungen für die bakteriell (*Listeria monocytogenes*) vermittelte Sekretion von IL-8 aus humanen Endothelzellen, jedoch nicht von IFN- γ nötig waren (Schmeck *et al.*, 2005). Auch eine durch *Chlamydomonas pneumoniae*-vermittelte endotheliale Inflammation zeigte unter anderem eine Pan-Acetylierung des Histon H4 sowie acetylierende und phosphorylierende Modifikationen des Histon H3 (Schmeck *et al.*, 2008).

Trichostatin A (TSA) ist ein hochpotenter HDAC-Inhibitor und wurde in vielen Studien über Histon-Acetylierungen verwandt (de Ruijter *et al.*, 2003). TSA interagiert mit der katalytischen Funktion der Histon-Deacetylasen und unterbindet die Abspaltung von Acetylgruppen von Lysinresten der Histone (Marks *et al.*, 2004). Um den Effekt der HDAC-Inhibition auf die durch oxLDL-induzierte Atherogenese in humanen Endothelzellen nachzuweisen, wurden humane venöse und aortale Endothelzellen mit Trichostatin A inkubiert. Die Inhibition von Histon-Deacetylasen durch TSA erbrachte dabei eine vermehrte Freisetzung von IL-8 und MCP-1. Dies deutet auf den signifikanten Effekt der Histon-Acetylierung im Rahmen der endothelialen Inflammation in humanen Endothelzellen hin. Bereits 1990 gab es Hinweise darauf, dass TSA zu einer spezifischen Hemmung der HDACs und damit zu einem verstärkten Acetylierungsstatus von Histonen in verschiedenen Zelllinien führte (Yoshida *et al.*,

1990). Tierversuche an Mäusen, welche LDL-Rezeptor-defizient (Ldlr(-/-)) waren, zeigten eine durch Trichostatin A ausgelöste Exazerbation der Atherosklerose in den Versuchstieren (Choi *et al.*, 2005). Analog zu den vorliegenden Ergebnissen wurde die Inhibition der HDACs erst kürzlich mit einer erhöhten Zytokinfreisetzung aus HUVECs und HAECs in Verbindung gebracht. Die Stimulation mit dem Bakterium *Chlamydomphila pneumoniae*, einem ebenfalls mit der Atherosklerose assoziierten Pathogen, erhöhte dabei nach zusätzlicher Hemmung der HDACs durch TSA die Freisetzung von IL-8 (Schmeck *et al.*, 2008).

Insgesamt indizieren diese Beobachtungen, dass Histonmodifikationen die Genexpression in oxLDL-exponiertem Endothel beeinflussen. Die oxLDL-abhängige Freisetzung von IL-8 und MCP-1 steht damit wohl im Zusammenhang. Die Acetylierung von Histonen scheint dabei einen besonderen Stellenwert zu besitzen.

4.3 Histonmodifikationen am *il8*- und *mcp1*-Genpromotor

Wie bereits erwähnt, tragen Histonmodifikationen wesentlich zur Genexpression in eukaryotischen Zellen bei (Turner, 2002; Jenuwein und Allis, 2001). Die Histon-Acetylierung wird durch HATs wie CBP/p300 und HDACs gegensätzlich reguliert; dabei bewirken die HATs eine Acetylierung der Histone, die HDACs eine Deacetylierung (Bucks und Olson, 2006; Eberharter *et al.*, 2005). Nach Stimulation von humanen Endothelzellen mit oxidierten LDL konnten eine verminderte Bindung der HDAC-Subtypen HDAC1 und HDAC2 sowie Rekrutierung des CBP/p300-Komplexes am *il8*- und *mcp1*-Genpromotor aufgezeigt werden. Ferner wurden die NF- κ B-Untereinheit p65, welche entscheidend für die IL-8-Expression ist (Liu und Malik, 2006), und die RNA-Polymerase II zu beiden Genpromotoren verstärkt rekrutiert. Auch zeigte sich am *il8*- und *mcp1*-Genpromotor eine durch oxidierte LDL induzierte Acetylierung von Histon H4 sowie Phosphorylierung (Ser-10), Acetylierung (Lys-14) und Dimethylierung (Lys-4) von Histon H3.

In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen konnten schon Agalioti *et al.* nachweisen, dass eine Phosphorylierung des Serinrest 10 und Acetylierung des Lysin 14 am Histon H3 und auch Acetylierung des Lysin 8 am Histon H4 in einer Bindung von transkriptionell wirkenden Faktoren und darauffolgender Gentranskription resultiert

(Agalioti *et al.*, 2002).

Auch haben vorangegangene Studien dargestellt, dass Histon-Phosphorylierungen und –Acetylierungen für die IL-8-Expression eine zentrale Bedeutung besitzen (Schmeck *et al.*, 2005; Hoshimoto *et al.*, 2002; Ashburner *et al.*, 2001). Im Besonderen die bakterielle Infektion mit *Chlamydomphila pneumoniae* wird vermehrt als Auslöser der endothelialen Inflammation und Entstehung der Atherosklerose angesehen (Liuba *et al.*, 2000). Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass *C. pneumoniae* in humanen Endothelzellen eine Acetylierung/ Phosphorylierung am Histon H3 sowie eine Acetylierung an Histon H4 des *i18*-Genpromotors induziert (Schmeck *et al.*, 2008). Auch fand sich dabei, analog zu den vorliegenden Ergebnissen, eine verstärkte Rekrutierung von NF- κ B/p65 und der RNA-Polymerase II an diesen Promotor.

Histonmodifikationen des *mcp1*-Genpromotors sind hinsichtlich endothelialer Entzündungsreaktionen bislang nicht untersucht, scheinen sich aber, wie im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen wurde, nach demselben Muster des *i18*-Genpromotors zu verhalten.

Zusammenfassend deuten diese Studien auf eine Sequenz von promotorbezogenen Ereignissen hin, die oxLDL-vermittelt zu Histon-Phosphorylierungen, Histon-Acetylierungen, Strukturänderung des Chromatins und erfolgreicher Gentranskription führen. Mehrere Histonmodifikationen sollten demnach erforderlich sein um die Transkription von IL-8 oder MCP-1 einzuleiten, wie es auch schon in der Hypothese des Histon-Codes postuliert wurde.

4.4 Statine beeinflussen Histonmodifikationen

Statine sind eine Gruppe von Medikamenten, welche die HMG-CoA-Reduktase, ein Enzym im Cholesterolfstoffwechsel, hemmen. Simvastatin ist ein potentes Medikament zur Senkung des Serumspiegels von LDL und trägt zur primären und sekundären Prävention der Atherosklerose bei (Pedersen *et al.*, 2000). Neben der Cholesterolreduktion werden Statinen auch günstige Effekte auf endotheliale und vaskuläre Funktionen zugeschrieben, welche auf eine Verminderung der Inflammation innerhalb der Gefäßwände zurückzuführen sind (Shishehbor *et al.*, 2006; Shishehbor *et al.*, 2003).

In dieser Arbeit wurde der Effekt von Simvastatin auf epigenetische Regulationsmechanismen und Zytokinexpression in humanen Endothelzellen untersucht.

Als Grundbeobachtung wurde dabei erkannt, dass Simvastatin die Freisetzung von zwei wichtigen proinflammatorischen Zytokinen (IL-8 und MCP-1) aus HUVEC und HAEC vermindert und damit bedeutende inflammatorische und chemotaktische Signalwege unterbindet. Weiterhin konnte demonstriert werden, dass Simvastatin die oxLDL-vermittelte Phosphorylierung, Acetylierung und Methylierung von Histon H3 reduzierte, jedoch nur geringe Effekte auf die H4-Acetylierung an den *il8*- und *mcp1*-Genpromotoren zeigte. Zusätzlich trug Simvastatin durch die Beeinflussung Histon-modifizierender Enzyme zur Inaktivierung der beiden untersuchten inflammatorischen Gene bei. So konnten eine vermehrte Bindung von HDAC1 und HDAC2 und Reduktion der Histon-Acetyltransferasen CBP/p300 bestimmt werden. Begleitet war dies von einer verminderten Bindung von NF- κ B/p65 und RNA-Polymerase II an beiden untersuchten Promotoren. Simvastatin verhinderte die Induktion von Histonmodifikationen, welche die oxLDL-induzierte Expression von MCP-1 und IL-8 bewirkt und führte somit zur Suppression der Genexpression.

Es wurde bereits nachgewiesen, dass Statine die Serumspiegel hyperlipidämischer Patienten von IL-8 und MCP-1 senken und auch die Sekretion dieser Zytokine aus HUVEC und monozytären Zellen normolipidämischer Spender *in vitro* reduzierend modulieren (Rezaie-Majd *et al.*, 2002). Patienten mit hyperlipidämischer Stoffwechsellage profitierten von der Gabe von Statinen durch Reduktion der MCP-1-Serumspiegel (Kowalski *et al.*, 2003). Simvastatin reduzierte auch die CCR2-Proteinexpression und -mRNA in Monozyten, die aus dem Blut hyperlipidämischer Patienten isoliert wurden (Han *et al.*, 2005). Weiterhin konnten Statine erfolgreich die durch oxidierte Lipoproteine induzierte Proliferation in humanen Endothelzellen unterbinden (Schaefer *et al.*, 2004). Erst vor kurzem demonstrierten Gan *et al.*, dass Statine die durch Trichostatin A induzierte Mindereexpression der gefäßprotektiven endothelialen NO-Synthase antagonisieren (Gan *et al.*, 2006). Einige Untersuchungen der letzten Zeit deuten auf positive Effekte der Statine auf die endotheliale und vaskuläre Funktion hin, die auf der Beeinflussung der kleinen GTP-bindenden Proteine, welche als molekulare Schalter in Signalwegen fungieren, beruhen (Brown *et al.*, 2006;

Rikitake und Liao, 2005). Jedoch ist der Einfluss der cholesterinunabhängigen Effekte der Statine bislang noch nicht umfassend evaluiert. Vieles weist aber auf eine bedeutende Rolle dieser pleiotropen Effekte hin. Inwieweit dabei Histonmodifikationen eine Rolle spielen, ist weitgehend unbekannt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Statine die *Chlamydophila pneumoniae*-vermittelte inflammatorische Aktivierung von humanen Endothelzellen reduzieren, indem sie Histonmodifikationen am *il8*-Genpromotor modulieren (Schmeck *et al.*, 2008). Bemerkenswerterweise wird dieses Bakterium ebenfalls mit der Initiierung oder Progression der Atherosklerose in Verbindung gebracht (Grayston, 2005; Krull *et al.*, 2005). Die Bedeutung der cholesterinunabhängigen Effekte wurde jüngst durch eine aktuelle klinische Studie abermals untermauert. So ließ sich keine zusätzliche Prävention der Atherosklerose nach Intensivierung der bereits bestehenden Cholesterinsenkung mit Simvastatin durch den intestinalen Cholesterinaufnahmeinhibitor Ezetimib nachweisen, obwohl es signifikant zu einer vermehrten LDL-Cholesterinsenkung kam (Kastelein *et al.*, 2008).

In der vorliegenden Arbeit kam es durch Simvastatin nur zur unwesentlichen Veränderung der H4-Acetylierung. Im Rahmen der *C. pneumoniae*-induzierten Inflammation in Endothelzellen wurde jedoch auch eine Beeinflussung dieser Acetylierungsstelle durch Simvastatin beobachtet (Schmeck *et al.*, 2008). Ein Grund dafür ist möglicherweise in der unterschiedlichen Interaktion von bakteriellen Pathogenen und oxLDL mit dem Endothel zu suchen. In der Arbeit von Schmeck *et al.* wurden endotheliale Histonmodifikationen über die GTPase Rac1 vermittelt (Schmeck *et al.*, 2008). Für oxidierte LDL wurde die Beeinflussung von RhoA, einem anderen Mitglied der GTPasen, beschrieben (Galle *et al.*, 2003). Es bleibt jedoch ungeklärt, über welche intrazellulären Mechanismen oxLDL zu Histonmodifikationen führen und wie diese durch Statine beeinflusst werden.

Dennoch ist es insgesamt sehr wahrscheinlich, dass Statine epigenetische Phänomene beeinflussen und auch auf dieser Regulationsebene anti-inflammatorische Effekte ausüben. Diskussionswürdig ist in diesem Zusammenhang auch die Frage nach der klinischen Relevanz. So könnte hypothetisch formuliert werden, dass der Unterdrückung der inflammatorischen Aktivierung und endothelialen Dysfunktion und somit des initialen Schrittes in der Atherogenese durch Statine eine signifikante Verminderung von kardiovaskulären Ereignissen folgen sollte. Die Frage nach einer

Erweiterung der klinischen Indikation von Statinen zur Primärprävention wird damit relevant.

Metaanalysen von randomisierten Kontrollstudien zur Primärprävention von Statinen zeigten für Patienten ohne kardiovaskuläre Erkrankungen eine signifikante Reduktion von großen kardio- und zerebrovaskulären Ereignissen, jedoch allenfalls geringe Effekte auf die Entstehung der koronaren Herzkrankheit oder Gesamtmortalität (Thavendiranathan *et al.*, 2006). Auch die kürzlich publizierte METEOR-Studie zeigte zwar eine signifikante Reduktion der Progression der Atherosklerose durch Rosuvastatin, jedoch nicht deren Manifestation (Crouse, III *et al.*, 2007). Weitere Erkenntnisse über die Entstehung der Atherosklerose, der auslösenden Faktoren und die Interaktion der beteiligten Strukturen im Kontext der gesamten humanbiologischen Pathophysiologie scheinen notwendig um diese Diskrepanz genauer zu erfassen. Allein die Fokussierung auf die Wirkweise der Statine lässt weiterhin Unklarheit darüber bestehen, welche weiteren spezifischen Histonmodifikationen durch Statine beeinflusst und über welche Signalwege diese vermittelt werden. Gleichwohl steht der Nutzen von Statinen zur Sekundärprävention kardiovaskulärer Ereignisse, auch im Einklang mit den vorliegenden Resultaten, außer Frage.

4.5 Oxidierte LDL und Histon-Deacetylasen (HDACs)

Chronischen inflammatorischen Prozessen werden eine Bedeutung bei der Expression von Histon-modifizierenden Enzymen zugesprochen (Adcock *et al.*, 2004; Cosio *et al.*, 2004; Adcock *et al.*, 2005). In der vorliegenden Arbeit führten oxidierte LDL in humanen Endothelzellen sowohl zu einer Reduktion der Expression von HDAC1 und HDAC2 als auch zu einer Verminderung der globalen intrazellulären HDAC-Aktivität. Weiterhin wiesen Endothelzellen atherosklerotisch veränderter Koronarien eine verminderte Expression der HDAC2 *in situ* auf. Schon in peripheren Lungen- und Alveolarmakrophagen von Patienten mit chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (COPD) zeigte sich eine herabgesetzte Expression der HDAC2 (Cosio *et al.*, 2004). Zusätzlich wurde kürzlich demonstriert, dass mit *Moraxella catarrhalis* infizierte Lungenepithelzellen verminderte HDAC2-Expression und HDAC-Aktivität aufweisen (Slevogt *et al.*, 2006). Dieser Argumentation folgend, zeigt eine Inhibition der HDACs

mittels Trichostatin A eine Exazerbation der Atherosklerose im Mausmodell (Choi *et al.*, 2005). Auch konnte eine durch Zigarettenrauch induzierte Inflammation in Makrophagen mit einer erniedrigten HDAC-Aktivität in Verbindung gebracht werden (Yang *et al.*, 2006).

Daraus wird ersichtlich, dass die reduzierte HDAC-Expression innerhalb chronisch entzündlicher Prozesse, wie denen innerhalb der Atherogenese, den Weg für eine Hyperacetylierung von proinflammatorischen Genen mit daraus folgender erhöhter Expression dieser Gene ebnet. Dies konnte bisher im Zusammenhang mit chronisch obstruktiver Lungenkrankheit und Atherosklerose beobachtet werden. Bemerkenswerterweise gelang es in diesem Zusammenhang auch zu zeigen, dass Simvastatin die HDAC-Aktivität *in vitro*, zumindest teilweise, wieder normalisierte. Auch hier zeigt sich demnach ein Effekt der Statine zur Suppression der inflammatorischen Genexpression womit sie der atherosklerotischen Läsion entgegen wirken.

Inhibition von HDACs wird seit kurzem mit anti-proliferativen Eigenschaften in Tumorgeweben, beispielsweise durch die Expression von Tumor-suppressor-Genen, in Zusammenhang gebracht (Vigushin *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2001). Viele HDAC-Inhibitoren befinden sich gegenwärtig in klinischen Studien in Erprobungsphasen als Anti-Tumor-Wirkstoffe (de Ruijter *et al.*, 2003). Auch werden HDAC-Inhibitoren antiinflammatorische Eigenschaften nachgesagt (Leoni *et al.*, 2005; Leoni *et al.*, 2002). So gibt es Anhaltspunkte, dass HDACs in unterschiedlichen Geweben entgegengesetzte Effekte bewirken können. Nach Erkenntnis einer vor kurzem publizierten Studie reduzierte Trichostatin A die Expression von VCAM-1 auf der Oberfläche von Endothelzellen und damit die Adhäsion von Monozyten (Inoue *et al.*, 2006). Dabei spielte der HDAC-Subtyp HDAC3 eine bedeutende Rolle.

Um die HDAC-Expression in humanen Endothelzellen im Rahmen der atherosklerotischen Inflammation besser quantifizieren zu können, ist eine detaillierte Untersuchung der einzelnen Subgruppen der HDACs notwendig, da diese eine differente Funktionalität und Regulation aufweisen könnten. In dieser Arbeit zeigten Gewebeproben atherosklerotisch veränderter Gefäße eine erniedrigte HDAC2-Expression. Auch andere Arbeiten weisen darauf hin, dass wenigstens die HDAC2 in entzündlichen Prozessen vermindert exprimiert wird. So zeigte eine in Makrophagen induzierte Überexpression der HDAC2 eine signifikant verminderte inflammatorische

Aktivität dieser Zellen (Ito *et al.*, 2006). Erwähnenswerterweise scheint sich auch in einer bestimmten Brustkrebszellpopulation eine erhöhte HDAC-Aktivität auf die vermehrte Expression von IL-8, welche mit einer inflammatorischen Tumorprogression in Verbindung gebracht wird, repressiv auszuwirken (Chavey *et al.*, 2008).

Trotz umfangreicher Forschung über die biologischen Funktionen von Histon-Acetylierungen ist insgesamt wenig über die Rolle von Histon-Acetylierungen in der Atherosklerose bekannt. Jedoch wurden in dieser und anderen Arbeiten Hinweise erbracht, dass Histon-Acetylierung eine Rolle in der Atherogenese spielt. Dabei könnte die Kontrolle der Histon-Acetylierungen den Prozess der Atherogenese wesentlich beeinflussen.

4.6 Ausblick

Die vorliegende Arbeit konnte darstellen, dass spezifische epigenetische Mechanismen die oxLDL-vermittelte inflammatorische Genexpression im Rahmen der Atherosklerose in humanen Endothelzellen beeinflussen. Durch die genauere Identifizierung der zur endothelialen Inflammation führenden Genregulationen ist darauf zu hoffen, die pathophysiologischen Kenntnisse der zur Atherosklerose führenden Mechanismen zu erweitern und die Entwicklung neuer Therapiestrategien zur Behandlung der atherosklerotischen Erkrankungen fortzusetzen. So könnte die Modulation der Aktivität von HATs und HDACs zur Entwicklung von neuen antiinflammatorischen Ansätzen führen. Der HDAC-Inhibitor Trichostatin A, der bislang mit neuen Therapieansätzen in der Behandlung von Tumorerkrankungen assoziiert wurde, bewirkte in den in dieser Arbeit vorgenommenen Versuchen eine vermehrte Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-8 und MCP-1. Allerdings wurde beispielsweise auch berichtet, dass TSA die Proliferation von glatten Muskelzellen der Ratte hemmt und somit eher der Atherosklerose entgegensteuert (Okamoto *et al.*, 2006). Der Grund für diese gegensätzlichen Effekte ist unklar, könnte aber unter anderem auf die verschiedenen Zelltypen zurückzuführen sein. Der Stellenwert von TSA für die Atherosklerose und damit der HDACs ist weiterhin unbekannt. Die epigenetische Untersuchung weiterer an der Atherosklerose beteiligter Zelltypen und anderer pro- und antiinflammatorisch einwirkender Stimuli könnte jedoch weitere pathophysiologische

Erkenntnisse liefern, welche möglicherweise neue Therapieansätze aufzeigen.

Statine, für die die Modulation der HATs und HDACs in dieser Arbeit nachgewiesen wurde, könnten hierbei mitwirken und so neben der bereits etablierten Sekundärprävention kardiovaskulärer Ereignisse zu neuen therapeutischen Konzepten beitragen. So sind sicherlich auch kombinierte Ansätze denkbar, bei denen es durch differente Beeinflussung von Histonmodifikationen in verschiedenen Zelltypen zu synergistischen anti-atherosklerotischen Effekten kommt.

Obwohl in dieser Arbeit wichtige Histonmodifikationsstellen des Histon H3 und H4 des *il8*- und *mcp1*-Gens analysiert wurden, gibt es viele weitere Möglichkeiten der posttranslationalen Beeinflussung von Histonen. So sind viele Aminosäuren an anderen Positionen bekannt, die einer Acetylierung, Phosphorylierung oder Methylierung unterworfen sein können (Peterson und Laniel, 2004). Auch wurden die Histone H2A und H2B außer Acht gelassen. Somit ergeben die in dieser Arbeit untersuchten Modifikationen nur einen kleinen Einblick auf Histonveränderungen.

Weiterhin bleibt ungeklärt, welche Signalkaskaden die dargestellten Ereignisse verantworten. Es ist unbekannt, wie beispielsweise oxidierte LDL über den LOX-1-Rezeptor zu Histonmodifikationen und damit zur Beeinflussung proinflammatorischer Signalwege führen und wie Statine mit diesen Mechanismen interferieren (Mehta *et al.*, 2006; Kita, 1999). Beispielsweise könnte die durch oxLDL-vermittelte Stimulation von mitogen aktivierten Proteinkinasen (Tanigawa *et al.*, 2006) diese Modifikationen verursachen. Diese Art der Signalübertragung konnte für das *il8*-Gen in Endothelzellen nach Infektion mit dem Bakterium *Listeria monocytogenes* nachgewiesen werden (Schmeck *et al.*, 2005). Im Falle einer inflammatorischen Aktivierung durch *Chlamydomphila pneumoniae* wurde jedoch auch von einer Regulation durch GTPasen berichtet, welche zu Histonmodifikationen des *il8*-Genpromotors führte (Schmeck *et al.*, 2008). Ebenso ist wenig über die Regulation der HDAC-Expression und die Bedeutung der einzelnen Untergruppen der Histon-Deacetylasen in inflammatorisch aktivierten Gefäßwänden bekannt, obwohl viel auf eine wichtige und möglicherweise auch kardioprotektive Rolle der HDACs im kardiovaskulärem System hindeutet (Backs und Olson, 2006; Metzger, 2002; Zhang *et al.*, 2002).

Die Beeinflussung von Histonmodifikationen durch Simvastatin bietet ebenfalls neue Ansatzpunkte. Hierbei sind die modulierenden Eigenschaften vielleicht auch für

inflammatorische Prozesse anderer Genese als der Atherosklerose von therapeutischer Bedeutung. Interessant in diesem Zusammenhang ist weiterhin die Stellung der kleinen GTPasen, welche in jüngster Zeit vielfach mit proinflammatorischen Effekten in Verbindung gebracht wurden und durch Statine beeinflusst werden (Schmeck *et al.*, 2008; Rikitake und Liao, 2005). Die Wirkungen der Statine auf die einzelnen HDAC-Subklassen sind ebenfalls zur Zeit noch weitgehend unbekannt und bieten möglicherweise neue aufschlußreiche Erkenntnisse über die Beeinflussung inflammatorischer Prozesse. Dies gilt es, in zukünftigen Studien näher zu untersuchen.

5 Summary

Cardiovascular diseases, notably atherosclerosis are the most common cause of death in western industrial countries. Atherosclerosis is considered a chronic inflammatory disease.

The endothelium functions as a barrier that separates blood flow and intima of the vessel wall. Endothelial dysfunction is considered the initial step in the development of atherosclerosis.

Inflammatory activation of the endothelium by oxidized low-density lipoprotein (oxLDL) has been implicated in the development of chronic vascular lesions and coronary heart disease. OxLDL induces the release of cytokines by the endothelium, thereby promoting recruitment of inflammatory cells further aggravating inflammation. Interleukin-8 (IL-8) and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) are proinflammatory cytokines and significantly contribute to the development of atherosclerosis.

Increasing evidence indicates that histone modifications may be important for the transcriptional activity state of genes. Histone modifications describe specific alterations of chief proteins of chromatin. In this study the hypothesis that oxLDL-induced inflammatory gene expression is regulated by histone modifications was investigated and it was tried to experience the effect of statins in the regulation of these alterations.

OxLDL-related IL-8 and MCP-1 secretion in endothelial cells was reduced by simvastatin but was synergistically enhanced by the histone deacetylase inhibitor trichostatin A.

Treatment of endothelial cells with oxLDL induced acetylation of histone H4, and phosphorylation, acetylation and methylation of histone H3, both globally and on the promoters of *il-8* and *mcp-1*.

Pre-treatment of oxLDL-exposed cells with simvastatin reduced phosphorylation, acetylation and dimethylation of histone H3, as well as recruitment of histone acetylase CBP 300, NF- κ B p65/RelA and of RNA-Polymerase II at the *il-8* and *mcp-1* gene promoters. Moreover, simvastatin prevented loss of binding of histone deacetylase HDAC1 and HDAC2 to these promoters in oxLDL-exposed cells.

Furthermore, oxLDL reduced HDAC1 and 2 expression and simvastatin partly restored oxLDL-related reduction of global HDAC-activity *in vitro*. Additional *in situ* experiments indicated decreased expression of HDAC2 in endothelial cells in atherosclerotic plaques of human coronary arteries.

Taken together, histone modifications seem to play an important role in oxLDL-induced cytokine production by human endothelial cells. This study also suggests that some beneficial effects of statins in cardiovascular diseases may be based on the regulation of histone modifications of inflammatory genes.

Key words: atherosclerosis, endothelial cells, cytokines, statins, histone, HDAC.

6 Literaturverzeichnis

Adcock, I.M., Ito, K. und Barnes, P.J., 2004. Glucocorticoids: effects on gene transcription. *Proc.Am.Thorac.Soc.* 1(3), 247-254.

Adcock, I.M., Ito, K. und Barnes, P.J., 2005. Histone deacetylation: an important mechanism in inflammatory lung diseases. *COPD.* 2(4), 445-455.

Agalioti, T., Chen, G. und Thanos, D., 2002. Deciphering the transcriptional histone acetylation code for a human gene. *Cell* 111(3), 381-392.

Andalibi, A., Liao, F., Imes, S., Fogelman, A.M. und Lusis, A.J., 1993. Oxidized lipoproteins influence gene expression by causing oxidative stress and activating the transcription factor NF-kappa B. *Biochem.Soc.Trans.* 21 (Pt 3)(3), 651-655.

Apostolopoulos, J., Davenport, P. und Tipping, P.G., 1996. Interleukin-8 production by macrophages from atheromatous plaques. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 16(8), 1007-1012.

Ashburner, B.P., Westerheide, S.D. und Baldwin, A.S., Jr., 2001. The p65 (RelA) subunit of NF-kappaB interacts with the histone deacetylase (HDAC) corepressors HDAC1 and HDAC2 to negatively regulate gene expression. *Mol.Cell Biol.* 21(20), 7065-7077.

Aviram, M., Hussein, O., Rosenblat, M. et al., 1998. Interactions of platelets, macrophages, and lipoproteins in hypercholesterolemia: antiatherogenic effects of HMG-CoA reductase inhibitor therapy. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 31(1), 39-45.

Ayer, D.E., 1999. Histone deacetylases: transcriptional repression with SINers and NuRDs. *Trends Cell Biol.* 9(5), 193-198.

Backs, J. und Olson, E.N., 2006. Control of cardiac growth by histone acetylation/deacetylation. *Circ.Res.* 98(1), 15-24.

Barnes, P.J., Adcock, I.M. und Ito, K., 2005. Histone acetylation and deacetylation: importance in inflammatory lung diseases. *Eur.Respir.J.* 25(3), 552-563.

Barratt, M.J., Hazzalin, C.A., Cano, E. und Mahadevan, L.C., 1994. Mitogen-stimulated phosphorylation of histone H3 is targeted to a small hyperacetylation-sensitive fraction. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91(11), 4781-4785.

- Beisel, C., Imhof, A., Greene, J., Kremmer, E. und Sauer, F.**, 2002. Histone methylation by the Drosophila epigenetic transcriptional regulator Ash1. *Nature* 419(6909), 857-862.
- Blankenberg, S., Barbaux, S. und Tiret, L.**, 2003. Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 170(2), 191-203.
- Boenisch, T. H.** 2003. Handbuch Immunchemische Färbemethoden. DakoCytomation Corporation, Carpinteria, DakoCytomation GmbH, Hamburg.
- Boisvert, W.A.**, 2004. Modulation of atherogenesis by chemokines. *Trends Cardiovasc.Med.* 14(4), 161-165.
- Boisvert, W.A., Rose, D.M., Johnson, K.A. et al.**, 2006. Up-regulated expression of the CXCR2 ligand KC/GRO-alpha in atherosclerotic lesions plays a central role in macrophage accumulation and lesion progression. *Am.J.Pathol.* 168(4), 1385-1395.
- Boring, L., Gosling, J., Cleary, M. und Charo, I.F.**, 1998. Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 394(6696), 894-897.
- Brown, J.H., Del Re, D.P. und Sussman, M.A.**, 2006. The Rac and Rho hall of fame: a decade of hypertrophic signaling hits. *Circ.Res.* 98(6), 730-742.
- Brownell, J.E., Zhou, J., Ranalli, T. et al.**, 1996. Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell* 84(6), 843-851.
- Brunner, H., Cockcroft, J.R., Deanfield, J. et al.**, 2005. Endothelial function and dysfunction. Part II: Association with cardiovascular risk factors and diseases. A statement by the Working Group on Endothelins and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. *J.Hypertens.* 23(2), 233-246.
- Byrd, K.N. und Shearn, A.**, 2003. ASH1, a Drosophila trithorax group protein, is required for methylation of lysine 4 residues on histone H3. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100(20), 11535-11540.
- Cai, H. und Harrison, D.G.**, 2000. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ.Res.* 87(10), 840-844.
- Campbell, T.C., Parpia, B. und Chen, J.**, 1998. Diet, lifestyle, and the etiology of coronary artery disease: the Cornell China study. *Am.J.Cardiol.* 82(10B), 18T-21T.

- Carrozza, M.J., Utley, R.T., Workman, J.L. und Cote, J.**, 2003. The diverse functions of histone acetyltransferase complexes. *Trends Genet.* 19(6), 321-329.
- Charo, I.F. und Taubman, M.B.**, 2004. Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. *Circ.Res.* 95(9), 858-866.
- Chavey, C., Muhlbauer, M., Bossard, C. et al.**, 2008. Interleukin-8 expression is regulated by histone deacetylases through the NF- κ B pathway in breast cancer. *Mol.Pharmacol.*
- Chen, H., Tini, M. und Evans, R.M.**, 2001a. HATs on and beyond chromatin. *Curr.Opin.Cell Biol.* 13(2), 218-224.
- Chen, L., Fischle, W., Verdin, E. und Greene, W.C.**, 2001b. Duration of nuclear NF-kappaB action regulated by reversible acetylation. *Science* 293(5535), 1653-1657.
- Cheung, P., Allis, C.D. und Sassone-Corsi, P.**, 2000a. Signaling to chromatin through histone modifications. *Cell* 103(2), 263-271.
- Cheung, P., Tanner, K.G., Cheung, W.L. et al.**, 2000b. Synergistic coupling of histone H3 phosphorylation and acetylation in response to epidermal growth factor stimulation. *Mol.Cell* 5(6), 905-915.
- Chisolm, G.M. und Steinberg, D.**, 2000. The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. *Free Radic.Biol.Med.* 28(12), 1815-1826.
- Choi, J.H., Nam, K.H., Kim, J. et al.**, 2005. Trichostatin A exacerbates atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 25(11), 2404-2409.
- Claise, C., Edeas, M., Chalas, J. et al.**, 1996. Oxidized low-density lipoprotein induces the production of interleukin-8 by endothelial cells. *FEBS Lett.* 398(2-3), 223-227.
- Clayton, A.L. und Mahadevan, L.C.**, 2003. MAP kinase-mediated phosphoacetylation of histone H3 and inducible gene regulation. *FEBS Lett.* 546(1), 51-58.
- Cooke, J.P. und Tsao, P.S.**, 1994. Is NO an endogenous antiatherogenic molecule? *Arterioscler.Thromb.* 14(5), 653-655.
- Cooke, J.P. und Tsao, P.S.**, 2001. Go with the flow. *Circulation* 103(23), 2773-2775.
- Corti, R., Fayad, Z.A., Fuster, V. et al.**, 2001. Effects of lipid-lowering by simvastatin on human atherosclerotic lesions: a longitudinal study by high-resolution, noninvasive

magnetic resonance imaging. *Circulation* 104(3), 249-252.

Cosio, B.G., Tsaprouni, L., Ito, K. et al., 2004. Theophylline restores histone deacetylase activity and steroid responses in COPD macrophages. *J.Exp.Med.* 200(5), 689-695.

Crosio, C., Heitz, E., Allis, C.D., Borrelli, E. und Sassone-Corsi, P., 2003. Chromatin remodeling and neuronal response: multiple signaling pathways induce specific histone H3 modifications and early gene expression in hippocampal neurons. *J.Cell Sci.* 116(Pt 24), 4905-4914.

Crouse, J.R., III, Raichlen, J.S., Riley, W.A. et al., 2007. Effect of rosuvastatin on progression of carotid intima-media thickness in low-risk individuals with subclinical atherosclerosis: the METEOR Trial. *JAMA* 297(12), 1344-1353.

Cushing, S.D., Berliner, J.A., Valente, A.J. et al., 1990. Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 87(13), 5134-5138.

d'Uscio, L.V., Milstien, S., Richardson, D., Smith, L. und Katusic, Z.S., 2003. Long-term vitamin C treatment increases vascular tetrahydrobiopterin levels and nitric oxide synthase activity. *Circ.Res.* 92(1), 88-95.

Daugherty, A., Pure, E., fel-Butteiger, D. et al., 1997. The effects of total lymphocyte deficiency on the extent of atherosclerosis in apolipoprotein E^{-/-} mice. *J.Clin.Invest* 100(6), 1575-1580.

Davignon, J., 2004. The cardioprotective effects of statins. *Curr.Atheroscler.Rep.* 6(1), 27-35.

Davignon, J. und Ganz, P., 2004. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* 109(23 Suppl 1), III27-III32.

Davignon, J. und Leiter, L.A., 2005. Ongoing clinical trials of the pleiotropic effects of statins. *Vasc.Health Risk Manag.* 1(1), 29-40.

Dawson, T.C., Kuziel, W.A., Osahar, T.A. und Maeda, N., 1999. Absence of CC chemokine receptor-2 reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* 143(1), 205-211.

De Caterina, R., Libby, P., Peng, H.B. et al., 1995. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J.Clin.Invest* 96(1), 60-68.

de Ruijter, A.J., van Gennip, A.H., Caron, H.N., Kemp, S. und van Kuilenburg, A.B., 2003. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem.J.* 370(Pt 3), 737-749.

Drexler, H., 1998. Factors involved in the maintenance of endothelial function. *Am.J.Cardiol.* 82(10A), 3S-4S.

Eberharter, A., Ferreira, R. und Becker, P., 2005. Dynamic chromatin: concerted nucleosome remodelling and acetylation. *Biol.Chem.* 386(8), 745-751.

Egger, G., Liang, G., Aparicio, A. und Jones, P.A., 2004. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 429(6990), 457-463.

Ermert, L., Hocke, A.C., Duncker, H.R., Seeger, W. und Ermert, M., 2001. Comparison of different detection methods in quantitative microdensitometry. *Am J Pathol.* 158(2), 407-417.

Esper, R.J., Nordaby, R.A., Vilarino, J.O. et al., 2006. Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal. *Cardiovasc.Diabetol.* 5 4.

Faxon, D.P., Fuster, V., Libby, P. et al., 2004. Atherosclerotic Vascular Disease Conference: Writing Group III: pathophysiology. *Circulation* 109(21), 2617-2625.

Fernandes, I., Bastien, Y., Wai, T. et al., 2003. Ligand-dependent nuclear receptor corepressor LCoR functions by histone deacetylase-dependent and -independent mechanisms. *Mol.Cell* 11(1), 139-150.

Fichtlscherer, S., Breuer, S. und Zeiher, A.M., 2004. Prognostic value of systemic endothelial dysfunction in patients with acute coronary syndromes: further evidence for the existence of the "vulnerable" patient. *Circulation* 110(14), 1926-1932.

Fischle, W., Kiermer, V., Dequiedt, F. und Verdin, E., 2001. The emerging role of class II histone deacetylases. *Biochem.Cell Biol.* 79(3), 337-348.

Frei, B., Stocker, R. und Ames, B.N., 1988. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 85(24), 9748-9752.

Galkina, E. und Ley, K., 2007. Vascular adhesion molecules in atherosclerosis. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 27(11), 2292-2301.

Galle, J., Mameghani, A., Bolz, S.S. et al., 2003. Oxidized LDL and its compound lysophosphatidylcholine potentiate AngII-induced vasoconstriction by stimulation of RhoA. *J.Am.Soc.Nephrol.* 14(6), 1471-1479.

- Gan, Y., Shen, Y.H., Utama, B. et al.**, 2006. Dual effects of histone deacetylase inhibition by trichostatin A on endothelial nitric oxide synthase expression in endothelial cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 340(1), 29-34.
- Gerard, C. und Rollins, B.J.**, 2001. Chemokines and disease. *Nat.Immunol.* 2(2), 108-115.
- Gerszten, R.E., Garcia-Zepeda, E.A., Lim, Y.C. et al.**, 1999. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature* 398(6729), 718-723.
- Glass, C.K. und Witztum, J.L.**, 2001. Atherosclerosis. the road ahead. *Cell* 104(4), 503-516.
- Goldstein, J.L. und Brown, M.S.**, 1990. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 343(6257), 425-430.
- Gosling, J., Slaymaker, S., Gu, L. et al.**, 1999. MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B. *J.Clin.Invest* 103(6), 773-778.
- Grant, P.A.**, 2001. A tale of histone modifications. *Genome Biol.* 2(4), REVIEWS0003.
- Grant, P.A., Eberharter, A., John, S. et al.**, 1999. Expanded lysine acetylation specificity of Gcn5 in native complexes. *J.Biol.Chem.* 274(9), 5895-5900.
- Grayston, J.T.**, 2005. Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis. *Clin.Infect.Dis.* 40(8), 1131-1132.
- Griendling, K.K., Sorescu, D. und Ushio-Fukai, M.**, 2000. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ.Res.* 86(5), 494-501.
- Gu, L., Okada, Y., Clinton, S.K. et al.**, 1998. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol.Cell* 2(2), 275-281.
- Han, K.H., Chang, M.K., Boullier, A. et al.**, 2000. Oxidized LDL reduces monocyte CCR2 expression through pathways involving peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J.Clin.Invest* 106(6), 793-802.
- Han, K.H., Ryu, J., Hong, K.H. et al.**, 2005. HMG-CoA reductase inhibition reduces monocyte CC chemokine receptor 2 expression and monocyte chemoattractant protein-1-mediated monocyte recruitment in vivo. *Circulation* 111(11), 1439-1447.

Hansen, J.C., Tse, C. und Wolffe, A.P., 1998. Structure and function of the core histone N-termini: more than meets the eye. *Biochemistry* 37(51), 17637-17641.

Hansson, G.K., 2001. Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 21(12), 1876-1890.

Henriksen, T., Mahoney, E.M. und Steinberg, D., 1982. Interactions of plasma lipoproteins with endothelial cells. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 401 102-116.

Hess-Stumpp, H., 2005. Histone deacetylase inhibitors and cancer: from cell biology to the clinic. *Eur.J.Cell Biol.* 84(2-3), 109-121.

Hippenstiel, S. und Suttorp, N., 2003. Interaction of pathogens with the endothelium. *Thromb.Haemost.* 89(1), 18-24.

Hoffmann, E., ttrich-Breiholz, O., Holtmann, H. und Kracht, M., 2002. Multiple control of interleukin-8 gene expression. *J.Leukoc.Biol.* 72(5), 847-855.

Holliday, R., 2006. Epigenetics: a historical overview. *Epigenetics.* 1(2), 76-80.

Holven, K.B., Myhre, A.M., Aukrust, P. et al., 2003. Patients with familial hypercholesterolaemia show enhanced spontaneous chemokine release from peripheral blood mononuclear cells ex vivo. Dependency of xanthomas/xanthelasms, smoking and gender. *Eur.Heart J.* 24(19), 1756-1762.

Hoshimoto, A., Suzuki, Y., Katsuno, T., Nakajima, H. und Saito, Y., 2002. Caprylic acid and medium-chain triglycerides inhibit IL-8 gene transcription in Caco-2 cells: comparison with the potent histone deacetylase inhibitor trichostatin A. *Br.J.Pharmacol.* 136(2), 280-286.

Huo, Y., Weber, C., Forlow, S.B. et al., 2001. The chemokine KC, but not monocyte chemoattractant protein-1, triggers monocyte arrest on early atherosclerotic endothelium. *J.Clin.Invest* 108(9), 1307-1314.

li, M. und Losordo, D.W., 2006. Statins and the endothelium. *Vascul.Pharmacol.*

Ikeda, U., 2003. Inflammation and coronary artery disease. *Curr.Vasc.Pharmacol.* 1(1), 65-70.

Ikeda, U., Matsui, K., Murakami, Y. und Shimada, K., 2002. Monocyte chemoattractant protein-1 and coronary artery disease. *Clin.Cardiol.* 25(4), 143-147.

- Inoue, K., Kobayashi, M., Yano, K. et al.**, 2006. Histone deacetylase inhibitor reduces monocyte adhesion to endothelium through the suppression of vascular cell adhesion molecule-1 expression. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 26(12), 2652-2659.
- Inoue, T., Komoda, H., Nonaka, M. et al.**, 2008. Interleukin-8 as an independent predictor of long-term clinical outcome in patients with coronary artery disease. *Int.J.Cardiol.* 124(3), 319-325.
- Ishigaki, Y., Katagiri, H., Gao, J. et al.**, 2008. Impact of plasma oxidized low-density lipoprotein removal on atherosclerosis. *Circulation* 118(1), 75-83.
- Ito, K., Barnes, P.J. und Adcock, I.M.**, 2000. Glucocorticoid receptor recruitment of histone deacetylase 2 inhibits interleukin-1beta-induced histone H4 acetylation on lysines 8 and 12. *Mol.Cell Biol.* 20(18), 6891-6903.
- Ito, K., Yamamura, S., Essilfie-Quaye, S. et al.**, 2006. Histone deacetylase 2-mediated deacetylation of the glucocorticoid receptor enables NF-kappaB suppression. *J.Exp.Med.* 203(1), 7-13.
- Jaffe, E.A., Nachman, R.L., Becker, C.G. und Minick, C.R.**, 1973. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J.Clin.Invest* 52(11), 2745-2756.
- Jenuwein, T. und Allis, C.D.**, 2001. Translating the histone code. *Science* 293(5532), 1074-1080.
- Jialal, I., Stein, D., Balis, D. et al.**, 2001. Effect of hydroxymethyl glutaryl coenzyme a reductase inhibitor therapy on high sensitive C-reactive protein levels. *Circulation* 103(15), 1933-1935.
- Jones, P.L. und Shi, Y.B.**, 2003. N-CoR-HDAC corepressor complexes: roles in transcriptional regulation by nuclear hormone receptors. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 274 237-268.
- Kastelein, J.J., Akdim, F., Stroes, E.S. et al.**, 2008. Simvastatin with or without ezetimibe in familial hypercholesterolemia. *N.Engl.J.Med.* 358(14), 1431-1443.
- Keslacy, S., Tliba, O., Baidouri, H. und Amrani, Y.**, 2006. INHIBITION OF TNF{alpha}-INDUCIBLE INFLAMMATORY GENES BY IFN{gamma} IS ASSOCIATED WITH ALTERED NF-{kappa}B TRANSACTIVATION AND ENHANCED HDAC ACTIVITY. *Mol.Pharmacol.*
- Kharbanda, R.K. und Deanfield, J.E.**, 2001. Functions of the healthy endothelium. *Coron.Artery Dis.* 12(6), 485-491.

Khorasanizadeh, S., 2004. The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell* 116(2), 259-272.

Kiernan, R., Bres, V., Ng, R.W. et al., 2003. Post-activation turn-off of NF-kappa B-dependent transcription is regulated by acetylation of p65. *J.Biol.Chem.* 278(4), 2758-2766.

Kim, I.A., Shin, J.H., Kim, I.H. et al., 2006. Histone deacetylase inhibitor-mediated radiosensitization of human cancer cells: class differences and the potential influence of p53. *Clin.Cancer Res.* 12(3 Pt 1), 940-949.

Kim, M.S., Kwon, H.J., Lee, Y.M. et al., 2001. Histone deacetylases induce angiogenesis by negative regulation of tumor suppressor genes. *Nat.Med.* 7(4), 437-443.

Kinlay, S., Libby, P. und Ganz, P., 2001. Endothelial function and coronary artery disease. *Curr.Opin.Lipidol.* 12(4), 383-389.

Kita, T., 1999. LOX-1, a possible clue to the missing link between hypertension and atherogenesis. *Circ.Res.* 84(9), 1113-1115.

Koch, A.E., Kunkel, S.L., Pearce, W.H. et al., 1993. Enhanced production of the chemotactic cytokines interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 in human abdominal aortic aneurysms. *Am.J.Pathol.* 142(5), 1423-1431.

Kodama, T., Reddy, P., Kishimoto, C. und Krieger, M., 1988. Purification and characterization of a bovine acetyl low density lipoprotein receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 85(23), 9238-9242.

Kornberg, R.D. und Lorch, Y., 1999. Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell* 98(3), 285-294.

Kouzarides, T., 2002. Histone methylation in transcriptional control. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 12(2), 198-209.

Kowalski, J., Okopien, B., Madej, A. et al., 2003. Effects of atorvastatin, simvastatin, and fenofibrate therapy on monocyte chemoattractant protein-1 secretion in patients with hyperlipidemia. *Eur.J.Clin.Pharmacol.* 59(3), 189-193.

Krull, M., Maass, M., Suttorp, N. und Rupp, J., 2005. Chlamydomytila pneumoniae. Mechanisms of target cell infection and activation. *Thromb.Haemost.* 94(2), 319-326.

Kumar, V., Abbas, A. K., Fausto, N. 2004. Robbins and Cotran Pathologic Basis of

Disease.

Leoni, F., Fossati, G., Lewis, E.C. et al., 2005. The histone deacetylase inhibitor ITF2357 reduces production of pro-inflammatory cytokines in vitro and systemic inflammation in vivo. *Mol.Med.* 11(1-12), 1-15.

Leoni, F., Zaliani, A., Bertolini, G. et al., 2002. The antitumor histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid exhibits antiinflammatory properties via suppression of cytokines. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99(5), 2995-3000.

Lerman, A. und Zeiher, A.M., 2005. Endothelial function: cardiac events. *Circulation* 111(3), 363-368.

Li, H., Cybulsky, M.I., Gimbrone, M.A., Jr. und Libby, P., 1993. An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium. *Arterioscler.Thromb.* 13(2), 197-204.

Liao, J.K. und Laufs, U., 2005. Pleiotropic effects of statins. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 45 89-118.

Libby, P., 2002. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420(6917), 868-874.

Libby, P., Ridker, P.M. und Maseri, A., 2002. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 105(9), 1135-1143.

Liu, S.F. und Malik, A.B., 2006. NF-kappa B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 290(4), L622-L645.

Liuba, P., Karnani, P., Pesonen, E. et al., 2000. Endothelial dysfunction after repeated Chlamydia pneumoniae infection in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation* 102(9), 1039-1044.

Lo, W.S., Trievel, R.C., Rojas, J.R. et al., 2000. Phosphorylation of serine 10 in histone H3 is functionally linked in vitro and in vivo to Gcn5-mediated acetylation at lysine 14. *Mol.Cell* 5(6), 917-926.

Löffler, G., Petrides, P. E. 2002. Biochemie und Pathobiochemie.

Luger, K., Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F. und Richmond, T.J., 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389(6648), 251-260.

Luscher, T.F. und Barton, M., 1997. Biology of the endothelium. *Clin.Cardiol.* 20(11 Suppl 2), II-10.

Lusis, A.J., 2000. Atherosclerosis. *Nature* 407(6801), 233-241.

Lutgens, E., Faber, B., Schapira, K. et al., 2005. Gene profiling in atherosclerosis reveals a key role for small inducible cytokines: validation using a novel monocyte chemoattractant protein monoclonal antibody. *Circulation* 111(25), 3443-3452.

Mahadevan, L.C., Willis, A.C. und Barratt, M.J., 1991. Rapid histone H3 phosphorylation in response to growth factors, phorbol esters, okadaic acid, and protein synthesis inhibitors. *Cell* 65(5), 775-783.

Marks, P.A., Richon, V.M., Miller, T. und Kelly, W.K., 2004. Histone deacetylase inhibitors. *Adv.Cancer Res.* 91 137-168.

Martinovic, I., Abegunewardene, N., Seul, M. et al., 2005. Elevated monocyte chemoattractant protein-1 serum levels in patients at risk for coronary artery disease. *Circ.J.* 69(12), 1484-1489.

Mehta, J.L., Chen, J., Hermonat, P.L., Romeo, F. und Novelli, G., 2006. Lectin-like, oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1): a critical player in the development of atherosclerosis and related disorders. *Cardiovasc.Res.* 69(1), 36-45.

Metzger, J.M., 2002. HDAC lightens a heavy heart. *Nat.Med.* 8(10), 1078-1079.

Minucci, S. und Pelicci, P.G., 2006. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat.Rev.Cancer* 6(1), 38-51.

Morikawa, S., Takabe, W., Mataki, C. et al., 2002. The effect of statins on mRNA levels of genes related to inflammation, coagulation, and vascular constriction in HUVEC. Human umbilical vein endothelial cells. *J.Atheroscler.Thromb.* 9(4), 178-183.

Muegge, K., 2002. Preparing the target for the bullet. *Nat.Immunol.* 3(1), 16-17.

Nakajima, K., Nakano, T. und Tanaka, A., 2006. The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: the comparison of atherogenic effects on oxidized LDL and remnant lipoproteins in plasma. *Clin.Chim.Acta* 367(1-2), 36-47.

Ng, H.H., Robert, F., Young, R.A. und Struhl, K., 2003. Targeted recruitment of Set1 histone methylase by elongating Pol II provides a localized mark and memory of recent transcriptional activity. *Mol.Cell* 11(3), 709-719.

- Nightingale, K.P., O'Neill, L.P. und Turner, B.M.**, 2006. Histone modifications: signalling receptors and potential elements of a heritable epigenetic code. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 16(2), 125-136.
- Nishioka, K., Chuikov, S., Sarma, K. et al.**, 2002. Set9, a novel histone H3 methyltransferase that facilitates transcription by precluding histone tail modifications required for heterochromatin formation. *Genes Dev.* 16(4), 479-489.
- Nowak, S.J. und Corces, V.G.**, 2004. Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation. *Trends Genet.* 20(4), 214-220.
- Ogryzko, V.V., Schiltz, R.L., Russanova, V., Howard, B.H. und Nakatani, Y.**, 1996. The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* 87(5), 953-959.
- Okamoto, H., Fujioka, Y., Takahashi, A. et al.**, 2006. Trichostatin A, an inhibitor of histone deacetylase, inhibits smooth muscle cell proliferation via induction of p21(WAF1). *J.Atheroscler.Thromb.* 13(4), 183-191.
- Paravicini, T.M. und Touyz, R.M.**, 2008. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care* 31 Suppl 2 S170-S180.
- Parthasarathy, S., Wieland, E. und Steinberg, D.**, 1989. A role for endothelial cell lipoxygenase in the oxidative modification of low density lipoprotein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 86(3), 1046-1050.
- Pedersen, T.R., Wilhelmsen, L., Faergeman, O. et al.**, 2000. Follow-up study of patients randomized in the Scandinavian simvastatin survival study (4S) of cholesterol lowering. *Am.J.Cardiol.* 86(3), 257-262.
- Peterson, C.L.**, 2002. HDAC's at work: everyone doing their part. *Mol.Cell* 9(5), 921-922.
- Peterson, C.L. und Laniel, M.A.**, 2004. Histones and histone modifications. *Curr.Biol.* 14(14), R546-R551.
- Prasad, A., Zhu, J., Halcox, J.P. et al.**, 2002. Predisposition to atherosclerosis by infections: role of endothelial dysfunction. *Circulation* 106(2), 184-190.
- Prigent, C. und Dimitrov, S.**, 2003. Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for? *J.Cell Sci.* 116(Pt 18), 3677-3685.

Reape, T.J. und Groot, P.H., 1999. Chemokines and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 147(2), 213-225.

Rezaie-Majd, A., Maca, T., Bucek, R.A. et al., 2002. Simvastatin reduces expression of cytokines interleukin-6, interleukin-8, and monocyte chemoattractant protein-1 in circulating monocytes from hypercholesterolemic patients. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22(7), 1194-1199.

Rikitake, Y. und Liao, J.K., 2005. Rho GTPases, statins, and nitric oxide. *Circ.Res.* 97(12), 1232-1235.

Roloff, T.C. und Nuber, U.A., 2005. Chromatin, epigenetics and stem cells. *Eur.J.Cell Biol.* 84(2-3), 123-135.

Rosenson, R.S., 1999. Non-lipid-lowering effects of statins on atherosclerosis. *Curr.Cardiol.Rep.* 1(3), 225-232.

Rosenson, R.S., 2004. Statins in atherosclerosis: lipid-lowering agents with antioxidant capabilities. *Atherosclerosis* 173(1), 1-12.

Ross, R., 1999. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N.Engl.J.Med.* 340(2), 115-126.

Rot, A. und von Andrian, U.H., 2004. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokines grammar for immune cells. *Annu.Rev.Immunol.* 22 891-928.

Roth, S.Y., Denu, J.M. und Allis, C.D., 2001. Histone acetyltransferases. *Annu.Rev.Biochem.* 70 81-120.

Rubanyi, G.M., 1993. The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and diseases. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 22 Suppl 4 S1-14.

Rubbo, H., Trostchansky, A., Botti, H. und Batthyany, C., 2002. Interactions of nitric oxide and peroxynitrite with low-density lipoprotein. *Biol.Chem.* 383(3-4), 547-552.

Saccani, S., Pantano, S. und Natoli, G., 2002. p38-Dependent marking of inflammatory genes for increased NF-kappa B recruitment. *Nat.Immunol.* 3(1), 69-75.

Sadava, D., Heller, C., Orians, G. H. 1997. Life: The Science of Biology. Sinauer Associates Inc.

Santos-Rosa, H., Schneider, R., Bannister, A.J. et al., 2002. Active genes are tri-

methylated at K4 of histone H3. *Nature* 419(6905), 407-411.

Sawamura, T., Kume, N., Aoyama, T. et al., 1997. An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Nature* 386(6620), 73-77.

Schaefer, C.A., Kuhlmann, C.R., Gast, C. et al., 2004. Statins prevent oxidized low-density lipoprotein- and lysophosphatidylcholine-induced proliferation of human endothelial cells. *Vascul.Pharmacol.* 41(2), 67-73.

Schmeck, B., Beermann, W., N'Guessan, P.D. et al., 2008. Simvastatin reduces Chlamydomonas pneumoniae-mediated histone modifications and gene expression in cultured human endothelial cells. *Circ.Res.* 102(8), 888-895.

Schmeck, B., Beermann, W., van, L., V et al., 2005. Intracellular bacteria differentially regulated endothelial cytokine release by MAPK-dependent histone modification. *J.Immunol.* 175(5), 2843-2850.

Schneider, R., Bannister, A.J., Myers, F.A. et al., 2004. Histone H3 lysine 4 methylation patterns in higher eukaryotic genes. *Nat.Cell Biol.* 6(1), 73-77.

Schober, A., Bernhagen, J., Thiele, M. et al., 2004. Stabilization of atherosclerotic plaques by blockade of macrophage migration inhibitory factor after vascular injury in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 109(3), 380-385.

Shepherd, J., Cobbe, S.M., Ford, I. et al., 1995. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N.Engl.J.Med.* 333(20), 1301-1307.

Shin, W.S., Szuba, A. und Rockson, S.G., 2002. The role of chemokines in human cardiovascular pathology: enhanced biological insights. *Atherosclerosis* 160(1), 91-102.

Shishehbor, M.H., Brennan, M.L., Aviles, R.J. et al., 2003. Statins promote potent systemic antioxidant effects through specific inflammatory pathways. *Circulation* 108(4), 426-431.

Shishehbor, M.H., Patel, T. und Bhatt, D.L., 2006. Using statins to treat inflammation in acute coronary syndromes: Are we there yet? *Cleve.Clin.J.Med.* 73(8), 760-766.

Simonini, A., Moscucci, M., Muller, D.W. et al., 2000. IL-8 is an angiogenic factor in human coronary atherectomy tissue. *Circulation* 101(13), 1519-1526.

Sims, R.J., III, Nishioka, K. und Reinberg, D., 2003. Histone lysine methylation: a signature for chromatin function. *Trends Genet.* 19(11), 629-639.

Slevogt, H., Schmeck, B., Jonat, C. et al., 2006. Moraxella catarrhalis induces inflammatory response of bronchial epithelial cells via MAPK and NF-kappaB activation and histone deacetylase activity reduction. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 290(5), L818-L826.

Spencer, V.A., Sun, J.M., Li, L. und Davie, J.R., 2003. Chromatin immunoprecipitation: a tool for studying histone acetylation and transcription factor binding. *Methods* 31(1), 67-75.

Spotswood, H.T. und Turner, B.M., 2002. An increasingly complex code. *J.Clin.Invest* 110(5), 577-582.

Statistisches Bundesamt Deutschland 2006. Todesursachen in Deutschland - Fachserie 12 Reihe 4 - 2006. SFG Servicecenter-Fachverlage.

Steffens, S. und Mach, F., 2004. Anti-inflammatory properties of statins. *Semin.Vasc.Med.* 4(4), 417-422.

Steinberg, D., 1997a. Lewis A. Conner Memorial Lecture. Oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation* 95(4), 1062-1071.

Steinberg, D., 1997b. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J.Biol.Chem.* 272(34), 20963-20966.

Steinberg, D. und Witztum, J.L., 1990. Lipoproteins and atherogenesis. Current concepts. *JAMA* 264(23), 3047-3052.

Steinberg, D. und Witztum, J.L., 2002. Is the oxidative modification hypothesis relevant to human atherosclerosis? Do the antioxidant trials conducted to date refute the hypothesis? *Circulation* 105(17), 2107-2111.

Strahl, B.D. und Allis, C.D., 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature* 403(6765), 41-45.

Strahl, B.D., Ohba, R., Cook, R.G. und Allis, C.D., 1999. Methylation of histone H3 at lysine 4 is highly conserved and correlates with transcriptionally active nuclei in Tetrahymena. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96(26), 14967-14972.

Struhl, K., 1998. Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes Dev.* 12(5), 599-606.

Sullivan, G.W., Sarembock, I.J. und Linden, J., 2000. The role of inflammation in vascular diseases. *J.Leukoc.Biol.* 67(5), 591-602.

- Tanigawa, H., Miura, S., Zhang, B. et al.**, 2006. Low-density lipoprotein oxidized to various degrees activates ERK1/2 through Lox-1. *Atherosclerosis* 188(2), 245-250.
- Tanner, F.C., Noll, G., Boulanger, C.M. und Luscher, T.F.**, 1991. Oxidized low density lipoproteins inhibit relaxations of porcine coronary arteries. Role of scavenger receptor and endothelium-derived nitric oxide. *Circulation* 83(6), 2012-2020.
- Tavridou, A., Efthimiadis, A., Efthimiadis, I. und Paschalidou, H.**, 2006. Antioxidant effects of simvastatin in primary and secondary prevention of coronary heart disease. *Eur.J.Clin.Pharmacol.* 62(6), 485-489.
- Tedgui, A. und Mallat, Z.**, 2006. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev.* 86(2), 515-581.
- Terkeltaub, R., Boisvert, W.A. und Curtiss, L.K.**, 1998. Chemokines and atherosclerosis. *Curr.Opin.Lipidol.* 9(5), 397-405.
- Thavendiranathan, P., Bagai, A., Brookhart, M.A. und Choudhry, N.K.**, 2006. Primary prevention of cardiovascular diseases with statin therapy: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Arch.Intern.Med.* 166(21), 2307-2313.
- Thiagalingam, S., Cheng, K.H., Lee, H.J. et al.**, 2003. Histone deacetylases: unique players in shaping the epigenetic histone code. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 983 84-100.
- Thomson, S., Mahadevan, L.C. und Clayton, A.L.**, 1999. MAP kinase-mediated signalling to nucleosomes and immediate-early gene induction. *Semin.Cell Dev.Biol.* 10(2), 205-214.
- Tonetti, M.S., D'Aiuto, F., Nibali, L. et al.**, 2007. Treatment of periodontitis and endothelial function. *N.Engl.J.Med.* 356(9), 911-920.
- Tousoulis, D., Antoniades, C., Bosinakou, E. et al.**, 2005. Effects of atorvastatin on reactive hyperemia and inflammatory process in patients with congestive heart failure. *Atherosclerosis* 178(2), 359-363.
- Tsimikas, S., Brilakis, E.S., Miller, E.R. et al.**, 2005. Oxidized phospholipids, Lp(a) lipoprotein, and coronary artery disease. *N.Engl.J.Med.* 353(1), 46-57.
- Tucci, M., Quatraro, C., Frassanito, M.A. und Silvestris, F.**, 2006. Deregulated expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in arterial hypertension: role in endothelial inflammation and atheromasia. *J.Hypertens.* 24(7), 1307-1318.
- Turner, B.M.**, 2002. Cellular memory and the histone code. *Cell* 111(3), 285-291.

Vanden, B.W., Vermeulen, L., Delerive, P. et al., 2003. A paradigm for gene regulation: inflammation, NF-kappaB and PPAR. *Adv.Exp.Med.Biol.* 544 181-196.

Verdin, E., Dequiedt, F. und Kasler, H.G., 2003. Class II histone deacetylases: versatile regulators. *Trends Genet.* 19(5), 286-293.

Vigushin, D.M., Ali, S., Pace, P.E. et al., 2001. Trichostatin A is a histone deacetylase inhibitor with potent antitumor activity against breast cancer in vivo. *Clin.Cancer Res.* 7(4), 971-976.

Wade, P.A., 2001. Transcriptional control at regulatory checkpoints by histone deacetylases: molecular connections between cancer and chromatin. *Hum.Mol.Genet.* 10(7), 693-698.

Wagner, D.D. und Frenette, P.S., 2008. The vessel wall and its interactions. *Blood* 111(11), 5271-5281.

Wang, G.P., Deng, Z.D., Ni, J. und Qu, Z.L., 1997. Oxidized low density lipoprotein and very low density lipoprotein enhance expression of monocyte chemoattractant protein-1 in rabbit peritoneal exudate macrophages. *Atherosclerosis* 133(1), 31-36.

Wei, Y., Mizzen, C.A., Cook, R.G., Gorovsky, M.A. und Allis, C.D., 1998. Phosphorylation of histone H3 at serine 10 is correlated with chromosome condensation during mitosis and meiosis in Tetrahymena. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95(13), 7480-7484.

West of Scotland Coronary Prevention Study Group, 1998. Influence of pravastatin and plasma lipids on clinical events in the West of Scotland Coronary Prevention Study (WOSCOPS). *Circulation* 97(15), 1440-1445.

WHO, 1958. CLASSIFICATION of atherosclerotic lesions; report of a study group. *World Health Organ Tech.Rep.Ser.* 57(143), 1-20.

Witztum, J.L. und Steinberg, D., 1991. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J.Clin.Invest* 88(6), 1785-1792.

Wu, C., 1997. Chromatin remodeling and the control of gene expression. *J.Biol.Chem.* 272(45), 28171-28174.

Yang, S.R., Chida, A.S., Bauter, M.R. et al., 2006. Cigarette smoke induces proinflammatory cytokine release by activation of NF-kappaB and posttranslational modifications of histone deacetylase in macrophages. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 291(1), L46-L57.

Yang, X.J., 2004. The diverse superfamily of lysine acetyltransferases and their roles in leukemia and other diseases. *Nucleic Acids Res.* 32(3), 959-976.

Yeh, M., Leitinger, N., de, M.R. et al., 2001. Increased transcription of IL-8 in endothelial cells is differentially regulated by TNF-alpha and oxidized phospholipids. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21(10), 1585-1591.

Yoshida, M., 2003. Potential role of statins in inflammation and atherosclerosis. *J. Atheroscler. Thromb.* 10(3), 140-144.

Yoshida, M., Kijima, M., Akita, M. und Beppu, T., 1990. Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J. Biol. Chem.* 265(28), 17174-17179.

Yoshida, M., Matsuyama, A., Komatsu, Y. und Nishino, N., 2003. From discovery to the coming generation of histone deacetylase inhibitors. *Curr. Med. Chem.* 10(22), 2351-2358.

Yusuf, S., Hawken, S., Ounpuu, S. et al., 2004. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet* 364(9438), 937-952.

Zegerman, P., Canas, B., Pappin, D. und Kouzarides, T., 2002. Histone H3 lysine 4 methylation disrupts binding of nucleosome remodeling and deacetylase (NuRD) repressor complex. *J. Biol. Chem.* 277(14), 11621-11624.

Zhang, C.L., McKinsey, T.A., Chang, S. et al., 2002. Class II histone deacetylases act as signal-responsive repressors of cardiac hypertrophy. *Cell* 110(4), 479-488.

Zhou, R.H., Shi, Q., Gao, H.Q. und Shen, B.J., 2001. Changes in serum interleukin-8 and interleukin-12 levels in patients with ischemic heart disease in a Chinese population. *J. Atheroscler. Thromb.* 8(1), 30-32.

7 Anhang

7.1 Publikationsverzeichnis

7.1.1 Originalarbeiten

N'Guessan, P.D., **Riediger, F.**, Vardarova, K., Scharf, S., Eitel, J., Opitz, B., Slevogt, H., Weichert, W., Hocke, A.C., Schmeck, B., Suttorp, N., and Hippenstiel, S., 2009. Statins control oxidized-LDL-mediated histone modifications and gene expression in cultured human endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*

7.1.2 Veröffentlichte Vorträge

Riediger, F., Schmeck, B., Vardarova, K., Opitz, B., Slevogt, H., Scharf, S., Zahlten, J., Suttorp, N., Hippenstiel, S., and N'Guessan, P.D., 2006. Statins reduce oxidized-LDL-mediated histone modifications and gene expression in cultured human endothelial cells. 17th European Students Conference at Charité Berlin.

7.2 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Stefan Hippenstiel und Herrn Dr. Dje Philippe N´Guessan danke ich sehr für die Bereitstellung des Themas und die intensive Betreuung dieser Arbeit. Ihnen ist das in mir erweckte Interesse an wissenschaftlicher Forschung zu verdanken. Herrn Prof. Dr. Norbert Suttorp danke ich für die Möglichkeit zur wissenschaftlichen Ausbildung.

Besondere Anerkennung gebührt Herrn Dr. Dje Philippe N´Guessan sowohl für die engagierte und ermutigende Begleitung meiner Forschung als auch für die freundschaftlichen Ratschläge während dieser Zeit.

Besonders herzlich danke ich auch Frau Dr. Hortense Slevogt und Herrn PD Dr. Bernd Schmeck für die fachliche und freundschaftliche Unterstützung.

Kerstin Möhr und Frauke Schreiber sei für die gute Einarbeitung, das gute Arbeitsklima und die Organisation im Labor gedankt.

Für die freundschaftliche Atmosphäre zu jeder Tages- und Nachtzeit möchte ich mich besonders bei Kremena Vardarova, Amira Rejaibi, Mirabelle Ollomang, Ines Hartmann, Bettina Keller, Lily Maqami und Manuel Viegelahn bedanken.

Jürgen Hembd gebührt mein ganz herzlicher Dank für seinen selbstlosen Beitrag zur Durchsicht dieser Arbeit.

Allen Freunden, im Besonderen Stefanie Herbst und Jens Holstein, danke ich sehr für die Unterstützung und Geduld, die sie mir trotz meiner zeitlichen Entbehrungen zuteil werden ließen.

Schließlich steht meinen Eltern höchste Anerkennung für ihre vorbehaltlose Unterstützung in jener Zeit zu, die es mir ermöglicht hat, diese Arbeit fertigzustellen.

7.3 Curriculum vitae

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

7.4 Eidesstattliche Erklärung

Ich, Fabian Riediger, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Bedeutung epigenetischer Vorgänge für die oxidierte LDL-induzierte Inflammation in humanen Endothelzellen“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, 30. März 2009

Fabian Riediger