

Aus der Medizinischen Klinik m.S. Gastroenterologie, Rheumatologie  
und Infektiologie  
Campus Benjamin Franklin  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Regulation der inflammatorischen Antwort von Makrophagen  
durch die Histondeacetylase 5

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Lukas Mathias Poralla

aus Mainz

Datum der Promotion: 26.02.2016

## Abkürzungsverzeichnis

bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
CBA	<i>cytometric bead array</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankungen
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung
Ct	<i>cycle treshold</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DSS	Dextran-Natriumsulfat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FCS	fetales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GM-CSF	Granulozyten-Macrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
HA	Hämagglutinin
HDAC	Histondeacetylase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HIF1 $\alpha$	Hypoxie induzierter Faktor 1 $\alpha$
IFN $\gamma$	Interferon $\gamma$
I $\kappa$ B	Inhibitor von $\kappa$ B
IL	Interleukin
IRAK	Interleukin-1 Rezeptor assoziierte Kinase
LB	<i>lysogeny broth</i>
LPS	Lipopolysaccharid
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein-1</i>
M-CSF	Macrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
MEF	<i>myocyte-specific enhancer-binding factor</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
MyD88	<i>myeloid differentiation primary response gene 88</i>
NF $\kappa$ B	Nukleärer Faktor- $\kappa$ B
NOD2	<i>nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2</i>
PBMC	mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PMA	Phorbol12-Myristat13-Acetat
PRRs	<i>pattern recognition receptors</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	quantitative Realtime-Polymerasekettenreaktion

RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	<i>small interfering</i> -Ribonukleinsäure
SOC	<i>super optimal broth with catabolite repression</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TAE	TRIS-Acetat-Ethylendiamintetraacetat
TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptor
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
T <sub>reg</sub>	<i>forkhead box P3</i> -positive regulatorische T-Zellen
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
YFP	gelb fluoreszierendes Protein

## Inhaltsverzeichnis

1	Abstrakt .....	1
2	Einleitung.....	4
2.1	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen und ihre Pathogenese.....	4
2.2	Bedeutung von Makrophagen in der Dysregulation des mukosalen Immunsystems bei CED .....	5
2.3	Toll-like Rezeptor 4-Stimulation von Makrophagen als essentieller Bestandteil der chronischen Entzündungsreaktion bei CED .....	7
2.4	Regulation der Polarisierung von Makrophagen.....	9
2.5	Epigenetische Veränderungen als Erklärungsmodell in der Pathogenese der CED.....	11
2.6	Histondeacetylasen .....	12
2.7	Funktionen der HDACs durch Interaktion mit Nicht-Histon-Proteinen .....	13
2.8	Bedeutung der HDACs für entzündliche Immunreaktionen .....	14
2.9	Entwicklung der Fragestellung .....	19
3	Material und Methoden.....	21
3.1	Chemikalien, Reagenzien, Materialien und Kits .....	21
3.2	Geräte .....	23
3.3	Puffer und Lösungen .....	24
3.4	Zelllinien und Stämme von <i>Escherichia coli</i> .....	26
3.5	Zellkulturmedien .....	27
3.6	Murine rekombinante Proteine.....	27
3.7	Oligonukleotide.....	27
3.8	Sequenzierung .....	29
3.9	Plasmide.....	30
3.10	Antikörper .....	31
3.11	Transformation von <i>Escherichia coli</i> .....	31
3.12	Plasmid-DNA-Präparation .....	32
3.13	DNA-Spaltung mit Restriktionsenzymen.....	32
3.14	Agarose-Gelelektrophorese.....	33
3.15	Nukleinsäure-Fragmentisolierung aus Agarosegelen .....	33
3.16	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen .....	34
3.17	Zellkultur.....	34

3.18	Inkubation von RAW 264.7- und U937-Zellen mit Proteinen und bakteriellem Lipopolysaccharid.....	35
3.19	Transfektion eukaryontischer Zellen durch Elektroporation.....	35
3.20	Ribonukleinsäure-Isolation aus Zelllysaten .....	36
3.21	Reverse Transkription .....	36
3.22	Polymerasekettenreaktion .....	37
3.22.1	Prinzip .....	37
3.22.2	Nachweis von Mykoplasmen-DNA in Zellkulturen.....	37
3.22.3	Standard-PCR.....	38
3.22.4	Ortsgerichtete Mutagenese .....	39
3.22.5	Quantitative Realtime-PCR .....	40
3.23	Durchflusszytometrie .....	43
3.23.1	Darstellung von Zellen .....	43
3.23.2	<i>Cytometric bead array</i> .....	43
3.24	Western-Blot.....	44
3.25	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> .....	45
3.26	Biolumineszenz zum Nachweis der Aktivierung des Nukleären Faktors- $\kappa$ B..	46
3.27	Statistik.....	46
4	Ergebnisse .....	47
4.1	Nachweis der HDAC5 in murinen und humanen Makrophagen .....	47
4.1.1	In primären Makrophagen .....	47
4.1.2	In den Zelllinien U937 und RAW 264.7 .....	48
4.2	Modulation der HDAC5-Expression durch pro- und anti-inflammatorische Stimuli in RAW 264.7-Zellen als Modell für murine Makrophagen.....	49
4.2.1	Kinetik der Wirkung von LPS.....	49
4.2.2	Kurzzeit-Kinetik der Wirkung von Tumornekrosefaktor $\alpha$ .....	51
4.2.3	Polarisierende, anti-inflammatorische sowie weitere pro-inflammatorische Faktoren .....	52
4.3	Funktionalität der HDAC5 in RAW 264.7-Zellen als Modell muriner Makrophagen .....	54
4.3.1	Etablierung von Transfektionsbedingungen zur Plasmid-vermittelten transienten Überexpression der HDAC5.....	54
4.3.2	Kinetik der transienten Überexpression der HDAC5 .....	56

4.3.3	Einfluss der transienten Überexpression der HDAC5 auf die Sekretion pro- und anti-inflammatorischer Faktoren .....	58
4.3.4	Regulation der Aktivierung des NFκB-Signalwegs durch transiente Überexpression der HDAC5.....	61
4.3.5	Etablierung von Transfektionsbedingungen zum siRNA-vermittelten transienten <i>knock down</i> der HDAC5-Expression .....	62
4.3.6	Kinetik des transienten <i>knock down</i> der HDAC5.....	64
4.3.7	Einfluss des transienten <i>knock down</i> der HDAC5 auf die Sekretion pro- und anti-inflammatorischer Faktoren .....	66
4.3.8	Aktivierung des NFκB-Signalwegs durch transienten <i>knock down</i> der HDAC5.....	67
4.3.9	Einfluss von simultaner HDAC5-Überexpression und - <i>knock down</i> auf die Sekretion pro-inflammatorischer Faktoren.....	68
4.4	Einfluss der Expressionsmodulation der HDAC5 auf die Expression anderer HDACs .....	70
4.4.1	Kinetik der Wirkung von LPS auf die Basisexpression der HDACs.....	70
4.4.2	Einfluss der transienten Überexpression der HDAC5 .....	72
4.4.3	Einfluss des transienten <i>knock down</i> der HDAC5 .....	73
4.5	Funktionalität der HDAC5 in U937-Zellen als Modell für humane monozytäre Zellen.....	75
4.5.1	Kinetik des siRNA-vermittelten transienten <i>knock down</i> der HDAC5..	75
4.5.2	Einfluss des transienten <i>knock down</i> der HDAC5 auf die Sekretion von TNFα .....	77
5	Diskussion .....	78
5.1	Ist die HDAC5 ein Regulator der inflammatorischen Reaktion von Makrophagen?.....	78
5.2	HDAC5 wird in murinen und humanen Makrophagen exprimiert.....	79
5.3	Pro-inflammatorische Faktoren regulieren die HDAC5-Expression in Makrophagen .....	82
5.4	Die Modulation der HDAC 5-Expression wirkt regulierend auf die Sekretion pro-inflammatorischer Faktoren durch Makrophagen.....	87
5.5	HDAC 5 beeinflusst die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine durch Regulation des NFκB-Signalweges und Interaktion mit HDAC 3.....	90
6	Schlussfolgerung und Ausblick.....	96

7	Literaturverzeichnis .....	99
8	Eidesstattliche Versicherung .....	113
9	Lebenslauf .....	115
10	Publikationsliste .....	117
11	Danksagung .....	118

## 1 Abstrakt

**Einleitung:** In der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen (CED) kommt es insbesondere durch eine überbordende Immunantwort der Makrophagen zu einer Dysregulation des mukosalen Immunsystems. Aufgrund des bereits bekannten regulatorischen Effektes der Histondeacetylase (HDAC)-Inhibitoren auf die Makrophagenaktivität wird ein therapeutischer Nutzen der HDAC-Inhibitoren für CED diskutiert. Um zu überprüfen, ob die entzündungshemmende Aktivität durch HDAC5 vermittelt wird, wurde die Regulation der HDAC5-Expression durch inflammatorische Stimuli sowie die immunregulatorische Funktion der HDAC5 in Makrophagen untersucht.

**Methodik:** Die basale HDAC5-Expression wurde in murinen und humanen primären Zellen sowie murinen RAW 264.7- und humanen U937-Zellen auf *messenger-Ribonukleinsäure*-Ebene bzw. durch Western-Blot auf Proteinebene nachgewiesen. Die Auswirkung inflammatorischer Stimuli auf die HDAC-Expression wurde mittels quantitativer Polymerasekettenreaktion (qPCR) in RAW 264.7-Zellen untersucht. Parallel wurde ein transients *knock down* durch Transfektion von *small interfering-Ribonukleinsäuren* bzw. eine Überexpression der HDAC5 durch Plasmid-Transfektion in den Makrophagen-Zelllinien etabliert. Der Effekt auf die Sekretion inflammatorischer Zytokine, die Aktivierung des nukleären Faktor  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) und die Expression anderer HDACs wurde durch *cytometric bead array* und *enzyme-linked immunosorbent assay* sowie Reporterplasmid-Transfektion mit anschließender Biolumineszenzmessung bzw. qPCR ermittelt.

**Ergebnisse:** HDAC5 wurde in humanen und murinen primären Zellen sowie den beiden murinen und humanen Zelllinien exprimiert. Eine kurzfristige Stimulation von RAW 264.7-Zellen mit Lipopolysaccharid führte zu einer signifikanten Steigerung der HDAC5-Expression. Die Überexpression der HDAC5 bewirkte eine erhöhte Sekretion von Tumornekrosefaktor  $\alpha$  und *monocyte chemoattractant protein-1*, eine vermehrte Aktivierung des NF $\kappa$ B-Signalweges sowie eine gesteigerte Expression der HDAC3 in RAW 264.7-Zellen. Dabei war der pro-inflammatorische Effekt der HDAC5 abhängig von der Aktivität der HDAC-Domäne. In Übereinstimmung mit den Daten der Überexpression führte eine verminderte HDAC5-Expression sowohl in den murinen RAW 264.7-Zellen als auch in den humanen U937-Zellen zu einer verminderten Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine und in RAW 264.7-Zellen zu einer

verringerten Expression der HDAC3. Durch eine längere Lipopolysaccharid-Stimulation bis zu sieben Stunden wurde die Expression der HDAC5 wie auch der anderen HDACs der Klasse II in RAW 264.7-Zellen vermindert, wohingegen die Expression von Vertretern der Klasse I wie HDAC1, 2 und 3 vorübergehend gesteigert wurde.

**Schlussfolgerung:** Die Expression der HDAC5 in Makrophagen wird durch inflammatorische Stimuli moduliert und reguliert die Immunantwort dieser Zellen. Dabei führt eine vermehrte HDAC5-Expression zu einer gesteigerten Entzündungsreaktion der Makrophagen durch Aktivierung des NF $\kappa$ B-Signalweges und zu einer vermehrten Expression der HDAC3. Die Identifizierung dieser pro-inflammatorischen Rolle der HDAC5 identifiziert sie als eine mögliche Zielstruktur für die Therapie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen.

**Introduction:** Overwhelming immune response by macrophages is a crucial factor in the dysregulation of the mucosal immunity, which takes part in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases (IBD). General inhibition of histone deacetylases (HDACs) modulates the immunological functions of macrophages. Therefore HDAC-inhibitors are considered as therapeutic options for IBD. Analysing the immunological function and the regulation of HDAC5 expression in macrophages should identify the contribution of individual HDAC to the overall anti-inflammatory effect of general HDAC-inhibition.

**Experimental procedures:** Expression of HDAC5 in murine and human primary macrophages as well as murine RAW 264.7 and human U937 cell lines was assessed at messenger ribonucleic acid level and by Western-blot analysis at protein level. The regulatory effect of inflammatory stimuli on the expression of HDACs was analysed in RAW 264.7 cells by quantitative polymerase chain reaction (qPCR). Transient knock down by transfection of small interfering ribonucleic acid and overexpression of HDAC5 by transfection of plasmid constructs was established in both cell lines. The impact on secretion of pro-inflammatory cytokines, activation of the nuclear factor  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) as well as expression of other HDAC subtypes was evaluated by cytometric bead array and enzyme-linked immunosorbent assay as well as by transfection of reporter plasmid with subsequent bioluminescence measurements and qPCR.

**Results:** Murine and human primary macrophages as well as murine RAW 264.7 and human U937 cells expressed low baseline levels of HDAC5. Short-term stimulation of RAW 264.7 cells with bacterial lipopolysaccharide significantly increased the expression of HDAC5. Secretion of tumor necrosis factor  $\alpha$  and monocyte chemoattractant protein-1, activation of NF $\kappa$ B signaling and expression of HDAC3 was enhanced by overexpression of HDAC5 in RAW 264.7 cells. This pro-inflammatory effect was dependent on the HDAC domain conferring enzymatic activity. Consistently, knock down of HDAC5 resulted in lower secretion of pro-inflammatory cytokines in RAW 264.7 cells as well as U937 cells and in a reduced expression of HDAC3 in RAW 264.7 cells. Long-term stimulation of RAW 264.7 cells up to seven hours diminished the expression of HDAC5 and other class II HDACs, whereas the expression of class I HDACs like HDAC1, 2 and 3 was transiently upregulated.

**Conclusion:** The expression of HDAC5 in macrophages is influenced by inflammatory stimuli and regulates the immune reaction of these cells. Increased expression of HDAC5 induces a pro-inflammatory response of macrophages by activating NF $\kappa$ B-signaling and augmented expression of HDAC3. Definiton of this pro-inflammatory function of HDAC5 enables the inhibiton of an individual HDAC subtype for therapy of IBD.

## 2 Einleitung

### 2.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen und ihre Pathogenese

Unter dem Begriff chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) werden immunvermittelte Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts zusammengefasst, die durch ihren intermittierenden oder persistierenden Verlauf die Lebensqualität der betroffenen Patienten stark beeinträchtigen. Es werden zwei Hauptformen der CED unterschieden: Kolitis ulcerosa und Morbus Crohn. Erstere zeichnet sich klassischer Weise durch einen kontinuierlichen Befall des Kolons und Rektums aus, bei dem die Entzündung auf die Mukosa und Submukosa beschränkt ist. Beim Morbus Crohn kann hingegen als transmurale Entzündung der gesamte Gastrointestinaltrakt diskontinuierlich befallen sein [1]. Obwohl durch die Entwicklung neuer anti-inflammatorischer Pharmaka wie zum Beispiel den Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ )-Antikörpern Infliximab und Adalimumab weitere Fortschritte in der Therapie der CED erreicht werden konnten, sind die Inzidenz und Prävalenz der CED weltweit steigend, wobei die kaukasische Bevölkerung in besonderer Weise von CED betroffen ist [2].

Die exakte Pathogenese der CED ist weiterhin unbekannt. Als Leithypothese wird aktuell angenommen, dass es bei genetisch prädisponierten Personen durch ein Zusammenwirken exogener sowie endogener Faktoren zu einer chronischen Dysregulation des mukosalen Immunsystems kommt. Zu den exogenen Faktoren zählen beispielsweise die Darmflora und aufgenommene Nahrungsbestandteile, aber auch Umweltfaktoren wie z.B. Rauchen, die das intestinale Immunsystem beeinflussen. Beispiele endogener Faktoren sind die intestinale Barriere sowie das angeborene und erworbene Immunsystem [3].

Während beim gesunden Menschen ein Gleichgewicht zwischen der Abwehr pathogener Keime auf der einen Seite und der Toleranz gegenüber apathogenen Bestandteilen der Nahrung und der kommensalen Bakterienflora auf der anderen Seite besteht, das eine überschießende Reaktion des mukosalen Immunsystems verhindert [4], kommt es bei CED zu einer gestörten Homöostase des mukosalen Immunsystems mit einer verminderten Toleranz und Hyperreagibilität gegenüber der apathogenen Darmflora und Nahrungsbestandteilen [5].

Genomweite Assoziationsstudien haben in den letzten Jahren weiterführende Erkenntnisse über die Krankheitsentwicklung durch die Entdeckung prädisponierender Gene hervorgebracht [6]. Als bedeutend für die Pathogenese der CED wurden dabei insbesondere Gene identifiziert, die eine wichtige Funktion bei der angeborenen Immunantwort gegenüber Bakterien und Viren besitzen, wie beispielsweise das *nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2* (NOD2) und *autophagy-related protein 16-1* [7-9]. NOD2 gehört neben den *toll-like* Rezeptoren (TLRs), den *retinoic acid-inducible gene 1-like receptors* und den *C-type lectin receptors* zu den *pattern-recognition receptors* (PRRs), die charakteristische molekulare Muster pathogener Erreger, die sogenannten PAMPs, wie Lipopolysaccharide (LPS), Peptidoglykane, Lipoteichoinsäuren und Nukleinsäuren erkennen. PRRs werden insbesondere von dendritischen Zellen und Makrophagen exprimiert und weisen damit auf die wichtige Rolle dieser Zellen in der Pathogenese der CED hin [10].

## **2.2 Bedeutung von Makrophagen in der Dysregulation des mukosalen Immunsystems bei CED**

Makrophagen werden anhand spezifischer Oberflächenmarker wie *cluster of differentiation* (CD) 68, F4/80, CD11b oder dem *macrophage colony-stimulating factor receptor* (CD115) von anderen Zelltypen unterschieden [11]. Klassisch aktivierte M1-Makrophagen weisen eine hohe Expression pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF $\alpha$ , Interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-18 und IL-23 auf und besitzen eine wichtige Funktion bei der Abwehr von Bakterien, Viren und Protozoen sowie in der Anti-Tumor-Immunität [12]. Alternativ aktivierte M2-Makrophagen exprimieren hingegen vor allem anti-inflammatorische Zytokine wie IL-10 und sind an der Wundheilung beteiligt [13]. Die Differenzierung in M1- und M2-Makrophagen ist jedoch nicht starr, sondern es besteht eine Plastizität, in der z.B. M1-Makrophagen IL-10 produzieren können und damit Eigenschaften von M2-Makrophagen besitzen [14, 15].

Die intestinalen Makrophagen stellen die größte Population der monozytären Phagozyten im menschlichen Körper dar [16]. Ihre Verteilung und Anzahl korreliert mit der bakteriellen Besiedlung der einzelnen Darmabschnitte und weist somit auf

ihre besondere protektive und immunregulatorische Funktion im Gastrointestinaltrakt hin [16]. Sie besitzen eine direkte Abwehrfunktion gegenüber luminalen Pathogenen, indem sie diese phagozytieren oder mithilfe von Sauerstoffradikalen bzw. hochreaktiven Stickstoffverbindungen eliminieren [17, 18]. Die immunologische Bedeutung dieser Abwehrfunktion konnte durch Studien zur chronischen Granulomatose bekräftigt werden, bei denen ein Defekt in Makrophagen, der die Abwehrreaktion mit Sauerstoffradikalen oder hochreaktiven Stickstoffverbindungen betrifft, mit einem erhöhten Risiko der Patienten für die Entstehung einer Kolitis einherging [19]. Andererseits verhindert das anti-inflammatorische Zytokinprofil der mukosalen Makrophagen jedoch auch eine überschießende Immunreaktion. Im Mausmodell erhöht die Depletion von Makrophagen das Risiko für die Entstehung einer experimentellen Kolitis [20] und F4/80-*knockout*-Mäuse können durch eine mangelhafte Differenzierung von *forkhead box P3*-positiven regulatorischen T-Zellen ( $T_{reg}$ ) keine Toleranz gegenüber luminalen Antigenen entwickeln [21].

Die intestinalen Makrophagen sind daher entscheidend am Gleichgewicht des mukosalen Immunsystems beteiligt, da sie auf der einen Seite das Eindringen von pathogenen Erregern in den Organismus verhindern und andererseits die mukosale Immunreaktion begrenzen. Eine Dysregulation von Makrophagen kann somit auf drei Arten zur einer chronischen Entzündung beitragen: Erstens durch eine übersteigerte Immunantwort gegenüber apathogener Mikrobiota oder Nahrungsbestandteilen, zweitens durch eine verminderte Abwehrfunktion, die das Eindringen von Erregern und eine chronische Stimulation des Immunsystems ermöglicht, und drittens durch eine mangelnde Begrenzung einer Entzündungsreaktion und den fehlenden Übergang in eine Restitution des immunologischen Gleichgewichts [3].

Sowohl in der Maus als auch im Menschen unterscheiden sich die Transkriptionsprofile peripherer Makrophagen deutlich von Makrophagen des Intestinaltrakts [22, 23]. Bei Stimulation ruhender intestinalen Makrophagen über ihre TLRs sezernieren sie entweder keine Zytokine [17, 23] oder vor allem anti-inflammatorische Faktoren, wie z.B. *transforming growth factor*  $\beta$  und IL-10 [22]. Das von den Makrophagen gebildete IL-10 ist wiederum essentiell für die Differenzierung von  $T_{reg}$  in der Lamina propria, die an der Aufrechterhaltung der Homöostase des intestinalen Immunsystems beteiligt sind [24]. Weiterhin phagozytieren die ruhenden mukosalen Makrophagen apoptotische Zellen und fördern die Wiederherstellung der

epithelialen Barriere [25, 26]. Somit ähnelt ihr Phänotyp dem der M2-Makrophagen [11]. Hierzu passend mildert im Mausmodell eine Injektion von M2-Makrophagen in Makrophagen-depletierten Tieren den Verlauf einer chemisch induzierten Kolitis ab [27].

Während einer Entzündung des Intestinaltraktes verändern sich Phänotyp und Aktivität der Makrophagen. Im Gegensatz zu den CD14<sup>-</sup> ruhenden intestinalen Makrophagen [11, 28], exprimieren die Makrophagen bei Patienten mit CED vermehrt TLRs und CD14, das an der Erkennung von LPS beteiligt ist [29]. Diese CD14<sup>+</sup> Makrophagen sezernieren große Mengen pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF $\alpha$ , IL-1 und IL-6 und ähneln daher eher dem Phänotyp der M1-Makrophagen [28]. Die entscheidende Rolle dieser Zellen in der Pathogenese der CED wurde durch Studien an IL-10<sup>-/-</sup>-Mäusen nachgewiesen, in denen die Depletion der intestinalen Makrophagen das Auftreten einer Kolitis supprimierte [30]. Da eine chemisch induzierte Kolitis durch eine Defizienz der TNF $\alpha$ -Sekretion in Makrophagen abgemildert wird [31], scheint insbesondere die Sekretion dieses Zytokins durch Makrophagen essentiell für die Entstehung einer chronischen Inflammation im Darm zu sein. Dies könnte darin begründet sein, dass TNF $\alpha$  das Enterozytenwachstum reguliert und die Permeabilität der epithelialen Barriere steigert [32].

Die bisherige Datenlage weist somit darauf hin, dass gerade die bakterielle Stimulation von Makrophagen über TLR4 und die daraus resultierende Sekretion von TNF $\alpha$  durch diese Zellen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der CED spielen.

### **2.3 Toll-like Rezeptor 4-Stimulation von Makrophagen als essentieller Bestandteil der chronischen Entzündungsreaktion bei CED**

TLRs sind Transmembranproteine, die von unterschiedlichen Zellen wie z.B. B-Zellen, natürlichen Killer-Zellen, Fibroblasten, Epithelzellen, dendritischen Zellen und Makrophagen exprimiert werden. Bisher wurden 11 verschiedene TLR-Subtypen beschrieben, von denen TLR1, 2, 4, 5, 6, 10 Bestandteil der äußeren Zellmembran sind und bakterielle Oberflächenantigene erkennen [33]. TLR4 wird von Endothelzellen, B-Zellen, Granulozyten, dendritischen Zellen und Makrophagen

exprimiert und ist essentiell für die Stimulation dieser Zellen durch LPS [34]. LPS entstammt der äußeren Membran von Gram-negativen Bakterien, wirkt im Organismus als Endotoxin und ist entscheidend an der Entstehung einer Kolitis beteiligt [35]. Es aktiviert die TLR4-Signalwege, indem es zunächst an LPS-bindendes Protein im Serum bindet. Das LPS-bindende Protein wiederum vermittelt die Bindung von LPS an CD14 auf der Zelloberfläche. Dieser Komplex aktiviert TLR4 und den *myeloid differentiation factor 2* und leitet dadurch die weiteren inflammatorischen Signalkaskaden ein [33].

Die TLR sind essentiell für die Unterscheidung zwischen pathogenen und apathogenen Bestandteilen der Nahrung bzw. der intestinalen Bakterienflora durch Makrophagen [36]. Die immunregulatorische Wertigkeit dieser Funktion konnte durch Tierversuche bestätigt werden, in denen ein Defekt von TLR4 mit einer höheren Translokation von Bakterien einhergeht [37]. Die vermehrte Translokation von Bakterien resultiert wiederum in einer erhöhten Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF $\alpha$  und steigert die Suszeptibilität für eine Kolitis im Mausmodell [38]. Somit erhöht eine verminderte TLR4-Aktivität das Risiko für die Entstehung einer Kolitis. Auch eine übersteigerte Aktivierung bzw. fehlende Inhibition der TLR4-Signalwege begünstigt die Entstehung einer Kolitis: So geht eine Mutation der *phosphoinositide-3-kinase*, die eine vermehrte Aktivierung der TLR-Signalwege bewirkt, mit der Entwicklung einer spontanen Kolitis im Mausmodell einher [39] und die fehlende Inhibition der TLR-Signalwege durch einen *knockout* von *paired immunoglobulin-like receptor B* führt zu einer vermehrten TNF $\alpha$ -Sekretion von Makrophagen und einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber einer Dextran-Natriumsulfat (DSS)-Kolitis im Mausmodell [40]. Eine Blockade des *triggering receptor expressed on myeloid cells-1*, der die TLR4-vermittelte Immunantwort von Makrophagen steigert, mildert den Verlauf einer Kolitis im Mausmodell ab [39], und auch in IL-10<sup>-</sup> *knockout*-Mäusen ist die Entstehung einer Kolitis von der Aktivität der TLR-Signalwege abhängig [41]. Eine klinische Studie, bei der eine vermehrte Expression der TLR2 und TLR4 [42] in intestinalen Makrophagen von CED-Patienten beobachtet wurde, bestätigt die Bedeutung dieser Interaktionen bei der menschlichen Erkrankung. Für bestimmte Polymorphismen von TLR4 wurde eine Assoziation mit der Entstehung von CED nachgewiesen [43]. Somit scheint gerade das TLR4-*signaling* in Makrophagen die Homöostase des mukosalen Immunsystems in

besonderer Weise zu beeinflussen und ein Ungleichgewicht in deren Regulation an der Entstehung von CED beteiligt zu sein.

Untersuchungen zu den am TLR-Signalweg beteiligten Molekülen zeigten, dass eine Aufhebung der PRR-Signalkette durch *knockout* von *myeloid differentiation primary response gene 88* (MyD88), das nach Stimulation mit LPS an den TLR bindet, zu einer erhöhten Suszeptibilität für intestinale Entzündungen führt [44, 45]. In ruhenden Makrophagen ist im Gegensatz zu den inflammatorischen Makrophagen nicht die Expression der TLRs verändert, sondern die nachgeschalteten TLR-Signalwege und die Aktivität des nukleären Faktor  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) in diesen Zellen sind inhibiert [23]. *Lactobacillus suntoryeus* inhibiert die Aktivierung des NF $\kappa$ B-Signalwegs über TLR4 und mildert so den Verlauf einer Kolitis ab [46]. Daher kann vermutet werden, dass gerade die Regulation der Signalwege, die nach der Stimulation von Makrophagen über ihre TLR aktiviert werden, wie z.B. der NF $\kappa$ B-Signalweg maßgeblich an der Homöostase des mukosalen Immunsystems und somit auch an der Entstehung chronischer Entzündungsprozesse beteiligt ist.

Entscheidend ist daher die Frage, wie die Immunantwort von Makrophagen und ihre Differenzierung zu einem pro- oder anti-inflammatorischen Phänotyp reguliert wird und dabei insbesondere wie und wodurch die TLR4-Signalwege in Makrophagen beeinflusst werden.

## **2.4 Regulation der Polarisierung von Makrophagen**

Die Polarisierung von Makrophagen wird durch das umgebende Gewebsumilieu beeinflusst. So bestimmen Zytokine, Chemokine, PAMPs, Fettsäuren, Immunglobuline, Hormone sowie adrenerge und cholinerge Mediatoren die Funktionalität und den Phänotyp der Makrophagen [47]. Dies spielt insbesondere bei der Aufrechterhaltung von chronischen Entzündungsprozessen eine wichtige Rolle. So bewirkt die Abwesenheit von IL-10 im murinen Kolitis-Modell eine pro-inflammatorische Differenzierung von Makrophagen, die zur Ausbildung einer Kolitis führt. Die Aufhebung dieses Effekts durch Gabe von IL-10 wiederum verdeutlicht, dass die Polarisierung der Makrophagen direkt von dem lokalen Zytokinprofil abhängig ist [48]. Experimente *in vitro* konnten nachweisen, dass das von T-Helfer 1-Zellen und natürlichen Killer-Zellen sezernierte Zytokin IFN $\gamma$  sowie die von Antigen-

präsentierenden Zellen freigesetzten Zytokine IL-12 und IL-18 eine Polarisierung zum pro-inflammatorischen Phänotyp der M1-Makrophagen induzieren [49, 50]. In gleicher Weise führt auch die Anwesenheit des Granulozyten-Macrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktors (GM-CSF) [51, 52] oder die Stimulation durch TLR-Liganden wie LPS zu einer M1-Polarisierung [49]. Die Zytokine IL-4 und IL-13, die von T-Helfer 2-Zellen sezerniert werden, bewirken hingegen eine Polarisierung zu M2-Makrophagen [50, 53]. Dies gilt ebenfalls für das bereits genannte Zytokin IL-10 sowie für den Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor (M-CSF), Immunkomplexe und Glukokortikoide [12, 51, 52, 54]. Auf der Ebene der Genregulation wird die Expression von Markerproteinen für M1-Makrophagen nach Stimulation mit TLR-Liganden durch die Transkriptionsfaktoren NFκB, AP-1, C/EBPβ, PU.1 und die *IFN-regulatory factors* gesteuert [55, 56]. Die Polarisierung zum M2-Phänotyp wird hingegen durch die Transkriptionsfaktoren *signal transducer and activator of transcription* (STAT) 6 und den *peroxisome proliferator-activated receptor-gamma* reguliert [50, 57].

Epigenetische Veränderungen, wie z.B. die Methylierung von Histonen, sind ebenfalls an der Regulation der Makrophagen-Differenzierung beteiligt. Auf der Ebene der Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen bewirkt eine verminderte Methylierung von Histonen eher eine myeloide und eine vermehrte Methylierung eher eine lymphoide Differenzierung [58]. Auch die Polarisierung der Makrophagen wird durch Methylierung und Demethylierung von Histonen reguliert. So wird die Expression von Markerproteinen für M2-Makrophagen durch Demethylierung an den Lysinresten 4 (H3K4) und 27 (H3K27) von Histon 3 mithilfe der Jumonji-C-Domäne der H3K27-Demethylase gesteuert [59]. In gleicher Weise wird auch die M1-Polarisierung durch Methylierung beeinflusst, da die Stimulation von Makrophagen mit TLR-Liganden zu einer Methylierung von H3K4 führt [56].

Neben der Methylierung spielt auch die Acetylierung von Histonen eine wichtige Rolle in der Polarisierung von Makrophagen. Ein *knockout* der Histondeacetylase (HDAC) 3 bewirkt eine Polarisierung zum anti-inflammatorischen M2-Phänotyp und vermindert *in vivo* die Entzündungsreaktion nach einer Infektion mit *Schistosoma mansoni* [60]. Zudem ist die Expression von zahlreichen pro-inflammatorischen, STAT-1-regulierten Genen abhängig von der Aktivität der HDAC3 [61]. Der anti-

inflammatorische Effekt von IL-10 auf die Polarisierung von Makrophagen hängt ebenfalls von der Aktivität der HDACs ab und wird insbesondere durch die HDAC3 vermittelt [62]. Die exakte Regulation der Makrophagenpolarisierung durch epigenetische Veränderung ist noch unklar, jedoch scheinen gerade die HDAC einen besonderen Einfluss auf die Makrophagen-Differenzierung und –Polarisierung zu besitzen.

## **2.5 Epigenetische Veränderungen als Erklärungsmodell in der Pathogenese der CED**

Die Interaktion des Organismus mit der Umwelt im Sinne einer Konfrontation mit exogenen Antigenen wie z.B. TLR-Liganden aus Nahrungsbestandteilen sowie inkorporierten Bakterien oder Viren ist fundamental für die Entwicklung des intestinalen Immunsystems. So entwickeln Mäuse, die in einer keimfreien Umgebung aufwachsen, kein intestinales Immunsystem [63]. Auch beim Menschen scheint ein Kontakt zu körperfremden Antigenen für die Reifung des intestinalen Immunsystems notwendig zu sein, da beim Neugeborenen direkt nach der Geburt noch keine inflammatorischen Zellen im Intestinaltrakt vorhanden sind [64]. Veränderungen der Umwelt, wie zum Beispiel die Verbesserung der hygienischen Zustände sowie die veränderten Ernährungsgewohnheiten werden als wichtige Faktoren bei der Entstehung von CED angenommen [65] und stellen eine mögliche Erklärung für den raschen Anstieg der Inzidenz der CED innerhalb weniger Jahrzehnte dar [2]. Da diese Veränderungen des Krankheitsvorkommens in kurzer Zeit jedoch nicht durch genetische Veränderungen der Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Sequenz selbst ermöglicht werden können, erscheinen epigenetische Modulationen als mögliche Mediatoren zwischen den sich in den letzten Jahrzehnten verändernden Lebensumständen und der erhöhten Inzidenz der CED. Exogene Faktoren wie zum Beispiel die Ernährung, virale bzw. bakterielle Infektionen oder die Zusammensetzung der Darmflora führen zu epigenetischen Veränderungen und Dysregulationen des mukosalen Immunsystems [66]. Auf der anderen Seite können jedoch auch epigenetische Faktoren z.B. die intestinale Bakterienflora beeinflussen [67], sodass eine Wechselwirkung zwischen der epigenetischen Regulation und den verschiedenen Umweltfaktoren angenommen werden kann.

Unter epigenetischer Regulation versteht man eine durch Mitose oder Meiose vererbte Variation der genetischen Expression, die nicht auf Veränderungen der Sequenz des Genoms beruht. Sie beinhaltet Modifikationen von DNA und Histonproteinen. Eukaryontische DNA liegt im Zellkern als Chromatin vor, das aus Nukleosomen besteht. Als Nukleosom wird ein DNA-Histon-Komplex bezeichnet, in dem ein 146 Basenpaare (bp)-langer DNA-Abschnitt um acht Histonproteine gewunden ist. Diese Struktur der DNA dient nicht nur der räumlichen Komprimierung, sondern reguliert darüber hinaus auch die Ablesung der DNA. So führt eine vermehrte Kondensation der DNA zu einer verminderten Transkription und umgekehrt [68]. Zu den epigenetischen Modifikationen zählen Acetylierung, Methylierung und Phosphorylierung aber auch Ubiquitinierung, Citrullinierung, Sumoylierung und Adenosindiphosphat-Ribosylierung [69]. Innerhalb der DNA werden Cytosin-Basen in CpG-Dinukleotiden methyliert. Die Histone werden an Serinresten phosphoryliert sowie an Lysin-, Histidin- und Argininresten enzymatisch methyliert oder acetyliert.

## **2.6 Histondeacetylasen**

HDACs sind evolutionär hoch konservierte Proteine, die bereits in Prokaryonten vorkommen [70, 71]. Sie katalysieren die Abspaltung von Acetylgruppen, die an Lysinresten gebunden sind. Namensgebend ist ihre Funktion der Deacetylierung von Histonen [72], durch welche positive Ladungen auf den Histonen frei werden, mit denen die negativ geladene DNA interagiert. Die vermehrte elektrostatische Wechselwirkung zwischen den Histonen und der DNA führt zu einer stärkeren DNA-Kondensation, wodurch die Bindung von Transkriptionsfaktoren inhibiert und konsekutiv die Transkription von Genen vermindert wird [73]. Eine mögliche Erklärung dafür, dass HDACs stärker in Bereichen aktiver Gene als in Bereichen inaktiver Gene binden [74] wäre die Wiederherstellung der DNA-Struktur durch die HDACs nach Acetylierung durch die in diesen Bereichen ebenfalls stark aktiven Histonacetyltransferasen. HDACs wirken aber nicht nur inhibierend, sondern können auch verstärkend auf die Transkription bestimmter Gene Einfluss nehmen [75]. Auf diese Weise regulieren HDACs durch Veränderung der Genexpression den Zellzyklus, die Zelldifferenzierung sowie die metabolische Aktivität von Zellen.

HDACs werden in zwei Familien unterteilt. Innerhalb der klassischen Familie der

HDACs wird zwischen den phylogenetischen Klassen I, II und IV unterschieden. Die HDACs der Klasse I ähneln der Histondeacetylase *relative protein digestibility 3* aus Hefen [76]. Zu dieser Klasse zählen die HDAC1, 2, 3 und 8. Die HDACs der Klasse II werden in die Subklasse IIa, zu denen die HDAC4, 5, 7 und 9 gehören, sowie die Subklasse IIb, zu der die HDAC6 und 10 zählen, unterteilt. Sie besitzen eine Ähnlichkeit zur HDA-A1 aus Hefen [77]. Die klassischen HDACs benötigen Zink als Kofaktor für ihre enzymatische Aktivität. Zu den Zink-abhängigen HDACs gehört auch die zuletzt entdeckte HDAC11, die sich phylogenetisch deutlich von allen zuvor bekannten Klassen unterscheidet und daher eine eigene Klasse IV bildet. Abzugrenzen von den klassischen HDACs ist die *silent information regulator 2*-Familie, die die Klasse III bildet und deren Deacetylase-Funktion von Nicotinamidadenindinukleotid abhängig ist [75, 78].

Eine Besonderheit der HDACs der Klasse II, auf die sich die vorliegende Arbeit konzentriert, ist ihre Fähigkeit zwischen Nukleus und Zytoplasma zu pendeln, da sie im Gegensatz zu den anderen HDAC-Klassen nicht nur ein *nuclear localization signal*, sondern auch ein *nuclear export signal* besitzen. Der Kern-Plasma-Transfer der HDACs der Klasse II wird durch Phosphorylierung von Serinresten am N-Terminus mit Hilfe von Kinasen wie z.B. der Kalzium-abhängigen Kinase, der Protein-Kinase D oder der *liver kinase B1*-abhängigen Kinase reguliert. Dabei wird durch die Phosphorylierung eine Interaktion mit dem 14-3-3-Protein ermöglicht, die den Export der HDACs aus dem Kern einleitet [79-84].

## **2.7 Funktionen der HDACs durch Interaktion mit Nicht-Histon-Proteinen**

Neben der bereits beschriebenen epigenetischen Regulation durch die Deacetylierung von Histonen wirken HDACs auch auf Nicht-Histon-Proteine. So verändert die Deacetylierung durch HDACs die Aktivität von Enzymen sowie die Ausbildung von Sekundärstrukturen und Bindungsdomänen von Proteinen. Beispielsweise ist die Expression von STAT1- und STAT2-abhängigen Genen durch Inhibitoren der HDACs gesenkt [85], durch Überexpression der HDACs hingegen gesteigert [86]. Post-transkriptionell können HDACs auch die Stabilität von *messenger*-Ribonukleinsäure (mRNA) regulieren. So führt beispielsweise eine Inhibition der HDACs zu einer reduzierten mRNA-Stabilität der endothelialen NO-

Synthetase oder der DNA-Methyltransferase-1 [86, 87]. HDACs nehmen auch auf die Stabilität und den *turnover* von Proteinen Einfluss, indem sie sowohl den proteasomalen als auch den nicht-proteasomalen Abbau von Proteinen regulieren [88, 89]. HDACs beeinflussen darüber hinaus den Zellzyklus, indem sie direkt mit Regulatoren der Replikation wie z.B. p21 und dem Retinoblastom-Protein interagieren [69].

Bisher sind HDAC-abhängige Effekte für über 60 Transkriptionsfaktoren sowie zahlreiche andere Proteine, die im Zusammenhang mit DNA-Reparatur, Replikation, Metabolismus, Apoptose, Transportvorgängen, Proteinfaltung und intrazellulären Signalwegen stehen, bekannt [69]. Durch die Wechselwirkungen mit Nicht-Histon-Proteinen greifen HDACs regulatorisch in zahlreiche intrazelluläre Prozesse ein. Diese Funktion der HDACs wird inzwischen als so bedeutend eingeschätzt, dass aktuell diskutiert wird, ob die Bezeichnung HDAC eher durch Lysin-Deacetylase oder Protein-Deacetylase ersetzt werden sollten, um dem erweiterten Wirkungsbereich der Deacetylasen gerecht zu werden [69, 75].

## **2.8 Bedeutung der HDACs für entzündliche Immunreaktionen**

HDACs besitzen eine wichtige Funktion bei der Entwicklung der angeborenen und erworbenen Immunantwort. So beeinflussen HDACs einerseits die Differenzierung myeloider Zellen sowie die TLR- und IFN $\gamma$ -Signalwege. Andererseits steuern sie auch die Antigenpräsentation sowie die B- und T-Zelldifferenzierung [90].

Die Wirkung der HDACs in Entzündungsprozessen wurde bisher vor allem durch den Einsatz der HDAC-Inhibitoren untersucht, die sowohl *in vitro* als auch *in vivo* anti-inflammatorische Effekte besitzen, indem sie die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 und IFN $\gamma$  durch monozytäre Zellen nach LPS-Stimulation senken [90, 91]. Aufgrund dieser Wirkung wurden HDAC-Inhibitoren bereits erfolgreich in Mausmodellen für chronisch-entzündliche Erkrankungen wie z.B. der experimentellen Arthritis eingesetzt [92]. In unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass HDAC-Inhibitoren auch in Modellen der akuten oder chronischen entzündlichen Darmerkrankung einen solchen anti-inflammatorischen Effekt besitzen [93].

In einer klinischen Studie wurde die Mobilität und der Gelenkbefall von 17 Patienten

mit juveniler Arthritis durch eine Therapie mit dem HDAC-Inhibitor ITF2357 verbessert. Dabei war die Dosierung um ein Vielfaches geringer als die zur Therapie von Malignomen [94].

Welche einzelnen HDACs für die anti-inflammatorischen Effekte verantwortlich sind, kann mit einer globalen HDAC-Inhibition nicht untersucht werden [95], jedoch sind bereits erste Zusammenhänge zwischen definierten HDAC-Subtypen und entzündlichen Immunreaktionen beschrieben.

In Gelenken von Patienten mit rheumatoider Arthritis ist die Expression der HDAC1 erhöht [96]. Der HDAC-Inhibitor MS-275, der eine Selektivität gegenüber HDAC1 besitzt, hemmt die Entzündung in Mausmodellen der chronischen Prostatitis [97], Arthritis [98] und autoimmunen Neuritis [99]. Ein *knock down* der HDAC1 reduziert *in vitro* die Expression pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-8 [100]. Eine Stimulation von Mamma-Karzinom-Zellen mit TNF $\alpha$  führt hingegen durch Ubiquitinierung zum Proteinabbau der HDAC1 und ermöglicht dadurch eine vermehrte Aktivierung des NF $\kappa$ B-Signalweges [101]. In einem murinen Asthma-Modell steigert eine Deletion der HDAC1 in T-Zellen die Krankheitsaktivität [102]. Zudem ist in Bronchialbiopsien von Patienten mit Asthma die Expression der HDAC1 vermindert [103]. Auch wenn die genauen Mechanismen, über die die HDAC1 in Entzündungsprozesse eingreift, ungeklärt sind, besitzt HDAC1 somit sowohl anti- als auch pro-inflammatorische Wirkungen in unterschiedlichen Zelltypen.

Die inflammatorische Bedeutung der HDAC2 wurde bisher insbesondere im Zusammenhang mit chronisch entzündlichen Erkrankungen der Lunge erforscht. So ist die Expression der HDAC2 in Makrophagen von Patienten mit einer chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) gegenüber gesunden Menschen deutlich vermindert [104]. Die pathogenetische Bedeutung dieser Expressionsveränderung wird durch Mausmodelle zu Asthma bronchiale und COPD bekräftigt, in denen HDAC2 einen anti-inflammatorischen Effekt in Makrophagen durch Interaktion mit dem NF $\kappa$ B-*activated gene complex* besitzt [104, 105]. In Bronchialbiopsien von Patienten mit Asthma ist zudem die Expression der HDAC2 vermindert [103]. Im Gegensatz zu diesen eher anti-inflammatorischen Eigenschaften im Lungengewebe bewirkt ein selektiver Defekt der HDAC2 in intestinalen Epithelzellen der Maus eine verminderte Krankheitsaktivität im DSS-Kolitis-Modell [106]. Zudem ist die

Expression der HDAC2 im Kolongewebe von Mäusen mit einer DSS-Kolitis vermehrt [107].

Die bisherigen Erkenntnisse zu den inflammatorischen Eigenschaften der HDAC3 sind divergent. So wurde einerseits eine verminderte Sekretion inflammatorischer Zytokine durch den *knock down* der HDAC3 in Makrophagen [61] und den HDAC3-selektiven Inhibitor MI192 in mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut (PBMC) von Patienten mit rheumatoider Arthritis nachgewiesen [108]. Zudem vermindert eine Inhibition der HDAC3 in einem murinen Anaphylaxie-Modell die kutane Entzündungsreaktion durch eine verminderte Expression von *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) [109] und im murinen DSS-Kolitis-Modell ist die Expression der HDAC3 im Kolongewebe im Vergleich zu gesunden Tieren vermehrt [107]. Andererseits wurde jedoch im Mausmodell zur COPD gezeigt, dass eine Hemmung der HDAC3 mit einer gesteigerten inflammatorischen Zytokinsekretion einhergeht [110].

HDAC4 supprimiert die Bildung von IL-5 in HEK293-Zellen [111]. In einem Adipositasmodell der Maus inhibiert HDAC4 die Transkription von NFκB-abhängigen Genen in aus dem Knochenmark von Mäusen isolierten Makrophagen [112]. Beim Menschen ist die Expression der HDAC4 im Knorpelgewebe von Patienten mit Osteoarthritis gegenüber gesunden Kontrollen vermindert [113]. Im Unterschied zu diesen anti-inflammatorischen Eigenschaften wird die HDAC4-Expression in glatten Muskelzellen der Ratte durch eine Stimulation mit TNFα auf mRNA- und Proteinebene gesteigert, während ein *knock down* der HDAC4 die Adhäsion von Makrophagen an diese Zellen und die Aktivierung des NFκB-Signalweges nach TNFα-Stimulation inhibiert [114]. Ein *knock down* der HDAC4 führt darüber hinaus zu einer verminderten Transkription des *hypoxia inducible factor 1α* (HIF1α) in Nierenkarzinomzellen, der eine wichtige Bedeutung in der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis besitzt [115]. Auch in der murinen Mikroglia-Zelllinie BV2 wird die Sekretion von IL-6 und TNFα durch einen *knock down* der HDAC4 vermindert [116]. Im murinen DSS-Kolitis-Modell der Maus ist die Expression der HDAC4 in glatten Muskelzellen sowie im gesamten Kolongewebe erhöht [107, 116].

Eine vermehrte Expression der induzierbaren NO-Synthetase durch HDAC5-Überexpression in RAW 264.7-Zellen gibt einen ersten Hinweis auf die immunregulatorische Funktion der HDAC5 [117]. LPS steigert in U937-Zellen nach vorangegangener Differenzierung mit Phorbol12-Myristat13-Acetat (PMA) die Bildung

der HDAC5 und von Proteinen des NFκB-Signalweges [118]. In der Maus steigert eine DSS-Kolitis die Expression der HDAC5 im Kolongewebe [107]. Eine Überexpression der HDAC5 in der humanen Monozyten-Zelllinie THP-1 reduziert eine NFκB-vermittelte TNFα-Expression [119]. Die selektiv erhöhte Expression der HDAC5 auf mRNA- und Protein-Ebene nach Infektion von humanen alveolären Epithelzellen mit *Legionella pneumophila* deutet auf die klinische Relevanz dieses Befundes hin [120]. In einer klinischen Studie bei COPD-Patienten korreliert eine verminderte Expression der HDAC5 in alveolären Makrophagen und im Lungengewebe negativ mit der IL-8-Sekretion und der Krankheitsschwere [121], eine weitere Studie zeigte hingegen eine unveränderte Expression der HDAC5 im Lungengewebe von COPD-Patienten [122].

Die HDAC6 fördert die Entstehung einer LPS-Toleranz in Astrozyten und kann dadurch chronische Entzündungsprozesse inhibieren [123]. Tubastatin, ein selektiver HDAC6-Inhibitor, inhibiert in humanen THP-1-Zellen die Expression von IL-6 und TNFα sowie in murinen RAW 264.7-Zellen die Expression von NO [124]. Zudem mildert Tubastatin den Krankheitsverlauf in einem Mausmodell zur Kollagen-induzierten Arthritis ab [124]. Im murinen Mausmodell zur kutanen Kontaktallergie reduziert der HDAC6-spezifische Inhibitor ACY-1215 die inflammatorische Hautreaktion [125]. In experimentellen DSS-Kolitis-Modellen erhöhen ein *knock down* bzw. die selektive Inhibition der HDAC6 die immunsuppressive Wirkung von T<sub>reg</sub> [126]. Zudem wird die Expression der HDAC6 im Kolongewebe durch eine DSS-Kolitis gesteigert [107]. Die Immunantwort von Makrophagen scheint durch die HDAC6 hingegen nicht beeinflusst zu werden, da ein *knockout* der HDAC6 die Expression pro-inflammatorischer Gene in diesen Zellen nicht verändert [127].

Die HDAC7 kann die inflammatorische Reaktion von HEK293-Zellen durch Regulation des HIF1α steigern [128]. Zudem wird die HDAC7 in einer LPS-induzierten neuronalen Entzündung im Gehirn von Ratten vermehrt exprimiert [129]. Eine DSS-Kolitis bewirkt ebenfalls eine Steigerung der Expression der HDAC7 im Kolongewebe der Maus [107]. Bei Menschen ist die HDAC7-Expression bei Patienten mit Osteoarthritis im Vergleich zu Gesunden im Knorpelgewebe erhöht [130].

Im Lungengewebe und in den Alveolarmakrophagen von Patienten mit schwerer COPD ist die HDAC8-Expression im Vergleich zu gesunden Kontrollen erniedrigt [121]. Im Gegensatz dazu hemmt eine selektive Inhibition der HDAC8 in humanen,

aus dem peripheren Blut isolierten Makrophagen die Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen [131] und im Kolongewebe von Mäusen wird die Expression der HDAC8 durch eine DSS-Kolitis gegenüber gesunden Tieren deutlich gesteigert [107].

Ein *knock down* der HDAC9 reduziert die pro-inflammatorische Antwort von T-Effektorzellen, da die Aktivierung der T-Zellen sowie die Sekretion inflammatorischer Zytokine inhibiert wird [132]. *In vivo* wird die Expression der HDAC9 durch eine DSS-Kolitis im Kolongewebe der Maus erhöht und ein *knockout* der HDAC9 führt zu einem milderem Verlauf der Kolitis [107]. In der Maus bewirkt ein *knockout* der HDAC9 zudem zu einer verminderten Atherosklerosebildung durch eine verminderte Expression pro-inflammatorischer Gene in Makrophagen [133]. Bei Patienten mit allergischem Asthma korreliert die Expression der HDAC9 in aus dem Blut isolierten Makrophagen mit der Schwere der Erkrankung [134].

Bezüglich der HDAC10 ist bisher nur bekannt, dass die DNA-Expression dieser HDAC im Lungengewebe von Emphysem-Patienten vermehrt ist [135].

Eine Überexpression der HDAC11 hemmt die Expression von IL-10 in RAW 264.7-Zellen, steigert die Expression von IL-12 und inhibiert die Expression von IL-10 in aus dem Knochenmark von Mäusen isolierten Makrophagen sowie humanen THP-1-Zellen und Antigen-präsentierenden Zellen [136].

Die Tabelle 1 fasst die bisher beschriebenen Wirkungen der einzelnen HDACs auf Entzündungsprozesse zusammen.

**Tab. 1: Immunregulatorische Effekte der einzelnen HDAC-Subtypen klassischer HDACs.** Zusammenfassung bisher beschriebener pro- und anti-inflammatorischer Effekte der HDAC1 bis 11 [96-136]

Klasse	HDAC	Effekt auf Entzündung	
		pro-inflammatorisch	anti-inflammatorisch
I	1	Mensch: rheumatoide Arthritis	Mensch: Mammakarzinom, Asthma bronchiale
		Maus: Arthritis, Prostatitis, Autoimmunneuritis	Maus: Asthma bronchiale
	2		Mensch: COPD, Asthma bronchiale
		Maus: Kolitis	Maus: COPD, Asthma bronchiale

	3	Mensch: rheumatoide Arthritis Maus: Anaphylaxie, Kolitis	Maus: COPD
	8	Maus: Kolitis	Mensch: COPD
IIa	4	Maus: Kolitis Ratte: Hypertonie	Mensch: Osteoarthritis Maus: Adipositas
	5	Mensch: <i>Legionella pneumophila</i> -Infektion Maus: Kolitis	Mensch: COPD
	7	Mensch: Osteoarthritis Maus: Kolitis Ratte: neuronale Entzündung	
	9	Mensch: Asthma bronchiale Maus: Kolitis, Atherosklerose	
IIb	6	Maus: Kolitis, Arthritis, Kontaktallergie	
	10	Mensch: Lungenemphysem	
IV	11		

Zusammenfassend sind die definierten Funktionen einzelner HDACs in akuten und chronischen Entzündungsprozessen in weiten Teilen unklar. Die bisherigen Ergebnisse weisen jedoch darauf hin, dass die immunregulatorische Wirkung der einzelnen HDACs vom jeweiligen Zelltyp sowie dem Organsystem abhängig ist, in dem sie exprimiert werden.

## 2.9 Entwicklung der Fragestellung

In der Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass der HDAC-Inhibitor ITF2357 die Polarisierung von aus der Maus isolierten T-Zellen zum pro-inflammatorischen Phänotyp Th17 inhibiert und die Polarisierung zu regulatorischen T-Zellen fördert.

Darüber hinaus vermindert ITF2357 auch die Zahl von Th17-Zellen in der Lamina propria von Mäusen bei einer DSS-Kolitis und mildert den Verlauf der Kolitis ab [137]. Um die für diesen anti-inflammatorischen Effekt verantwortlichen HDACs zu identifizieren, wurde die Expression einzelner HDACs in T-Zellen *in vitro* gehemmt. Dabei bewirkte insbesondere der *knock down* der HDAC5 eine Inhibition der inflammatorischen T-Zell-Antwort [138]. Bei Patienten mit rheumatoider Arthritis reduzieren HDAC-Inhibitoren die Expression von IL-6 und TNF $\alpha$  in Synovialmakrophagen [139]. Während einer *in vitro*-Polarisierung von Makrophagen treibt der HDAC-Inhibitor ITF 2357 diese in die Richtung eines M2-Phänotyps mit eher anti-inflammatorischer Kapazität [140]. Dies weist darauf hin, dass Makrophagen für den generellen Effekt der HDAC-Inhibitoren eine wichtige Rolle spielen. Anders als für T-Zellen gibt es aber noch keine Hinweise, welche einzelnen HDACs diese Wirkung vermitteln.

Aus den *knock down*-Experimenten, die auf eine besondere Funktion der HDAC5 in der inflammatorischen Immunreaktion von T-Zellen hinwiesen, ergaben sich für Makrophagen folgende Fragestellungen, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden:

1. Wie beeinflussen entzündungsrelevante Stimuli die Expression der HDAC5 in Makrophagen?
2. Wie reguliert HDAC5 die Expression entzündungsrelevanter Faktoren durch Makrophagen?
3. Wird diese Regulation durch NF $\kappa$ B vermittelt?
4. Welchen Einfluss hat die Expression der HDAC5 auf die Expression anderer HDACs?

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Chemikalien, Reagenzien, Materialien und Kits

β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure (HEPES)-Pufferlösung (steril, 1 M)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Acrylamidlösung (30%)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Agarose NEED Ultra	Carl Roth
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich
<i>Aqua destillata (Aqua dest.)</i>	Fresenius Kabi (Bad Homburg, Deutschland)
Bisacrylamidlösung (1,5%)	Carl Roth
Bovines Serumalbumin (BSA)	PAA Laboratories
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich
Dithiothreitolösung (100 mM)	Life Technologies (Carlsbad, USA)
DNA-Gelextraktionskit Qiaquick	Qiagen (Hilden, Deutschland)
DNA-Längenstandard DNA-Leiter <i>extended</i> 100 bp mit Gelladepuffer	Carl Roth
DNase I mit Reaktionspuffer (10fach konzentriert)	Life Technologies
dNTP-Stammlösung (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Carl Roth
Dulbecco's Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS)	PAA Laboratories
Elektroporationsküvetten mit 2 mm Spaltbreite	Biozym (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
Entwicklungsreagenz für Chemilumineszenz ECL <i>western blotting detection reagents</i>	GE Healthcare (Buckinghamshire, Großbritannien)
Entwicklungsreagenz für <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ELISA) Opt EIA TMB <i>substrate reagent set</i>	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
Ethanol	J.T. Baker (Deventer, Niederlande)
Ethylendiamintetraazetatlösung (25 mM)	Life Technologies
<i>Fetal calf serum</i> (FCS)	Linaris (Wertheim-Bettingen, Deutschland)
<i>First strand</i> -Puffer (5fach konzentriert)	Life Technologies
Formaldehyd (37°C)	Carl Roth
Gel-Blotting-Papier	Schleicher und Schuell (Dassel, Deutschland)

Glukose	Carl Roth
Glycerin	Carl Roth
Glycin	Carl Roth
Harnstoff	Carl Roth
Isopropanol	J.T. Baker
KAPA HiFi DNA-Polymerase-Kit	KAPA Biosystems (Boston, USA)
KCl	Merck
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck
Kit für den Nachweis gelöster Zytokine BD <i>cytometric bead array (CBA) mouse inflammation kit</i>	BD Biosciences
Kit für die Detektion eines Luciferase-Reporter-Gens	Sigma-Aldrich
Kit für Gelextraktion QIAquick	Qiagen
Kit für ortsgerechtere Mutagenese QuickChange	Stratagene (La Jolla, USA)
LB-Agar nach Lennox	Carl Roth
LB-Medium nach Lennox	Carl Roth
LPS <i>ultrapure Escherichia (E.) coli</i> 011:B4	Invivogen (San Diego, USA)
Methanol	J.T. Baker
MgCl <sub>2</sub>	Carl Roth
Mikrotiterplatten (weiß) mit 96 Vertiefungen für Biolumineszenzmessungen	Berthold (Bad Wildbad, Deutschland)
Milchpulver	Carl Roth
<i>Moloney murine leukemia</i> Reverse Transkriptase 200 U/μl	Life Technologies
Mykoplasmen-Polymerasekettenreaktion (PCR)-Detektionskit e-Myco plus	Intron Biotechnology (Sangdaewon-Dong, Südkorea)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Carl Roth
NaCl	Carl Roth
NaOH	Carl Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth
Natriumpyruvat-Lösung (steril, 100 mM)	PAA Laboratories
Oligo(dT)-Primer	Life Technologies
PCR Master Mix SYBR-Green	Life Technologies
Plasmid-Präparationskit für Maxipräparation aus <i>E coli</i> Nucleo Bond PC 500	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
Plasmid-Präparationskit für Minipräparation aus <i>E. coli</i> Invisorb Spin Plasmid Mini Two	Invitek (Berlin, Deutschland)
PMA	Sigma-Aldrich
Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran für Western-Blot Immobilon-P Porengröße 0,45 μm	Carl Roth
Ponceau S	Merck
Propidiumjodid (PI)-Lösung	Carl Roth
Protein-Standard <i>page ruler prestained protein ladder</i>	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

Reaktionsplatten für ELISA MaxiSorb mit 96 Vertiefungen und flachem Boden	Thermo Fisher Scientific
Realtime-PCR-Reaktionsplatten Micro Amp <i>fast optical 96-well reaction plate</i> mit Barcode für Step One Plus	Life Technologies
Restriktionsendonukleasen DpnI und KpnI mit Reaktionspuffer (10fach konzentriert)	New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)
Ribonukleaseinhibitor RNaseOUT	Life Technologies
RNA-Isolationskit RNeasy Mini	Qiagen
Stabile L-Glutamin-Lösung (steril, 200 mM)	PAA Laboratories
Taq-DNA-Polymerase-Kit	Invivogen
Tetramethylethyldiamin	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)-Lösung pH 8,0 (100 mM)	Carl Roth
TRIS-Acetat-Ethylendiamintetraacetat (TAE)-Puffer 50	Genaxxon BioSciences (Ulm, Deutschland)
Trypanblaulösung 0,05% in PBS	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
Tween 20	Carl Roth
Zählkammer nach Neubauer	LO Laboroptik (Bad Homburg, Deutschland)
Zellkulturmedium Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose (4,5 g/l)	PAA Laboratories
Zellkulturmedium Roswell Park Memorial Institute 1640	PAA Laboratories
Zellkulturplatten mit 6/12/24 Vertiefungen	BD Biosciences
Zellkulturflaschen BD Falcon 75 cm <sup>2</sup> , 150 cm <sup>2</sup>	BD Biosciences
Zellscraper	Sarstedt (Newton, USA)

### 3.2 Geräte

Analysewaage BD 210D	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Autoklav Varioklav 500 E	H+P Labortechnik (Oberschleißheim, Deutschland)
Begasungsbrutschrank Heracell 150	Thermo Fisher Scientific
Chemilumineszenzdetektor LAS-4000 mit Software LAS Image Reader (Version 2.1)	Fujifilm (Tokyo, Japan)
Durchflusszytometer BD FACS Canto II mit Software FACS Diva (Version 6) und Software FCAP Array™ (Version 1)	BD Biosciences
Eisbereiter AF 100	Scotsman (Bettolino di Poliano, Italien)
Elektroporator Elporator 1000	Eigenbau Dr. Thorsten Stroh
Horizontalschüttler VXR Basic Vibrax	IKA (Staufen, Deutschland)
Kammer für vertikale Polyacrylamid-	Bio-Rad Laboratories

Gelelektrophorese (PAGE) Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell mit Gießeinrichtung	
Kammern für horizontale Agarose-Gel-Elektrophorese Perfect Blue Mini M/L	Peqlab (Erlangen, Deutschland)
Kompaktschüttler KS Control 15 mit Inkubationshaube TH 15	Edmund Bühler (Hechingen, Deutschland)
Kühlschrank Comfort Gastroline 4°C	Liebherr (Biberach, Deutschland)
Kühlzentrifuge 5810 R	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Magnetrührer RH-KT-C	IKA
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank mit laminarem Luftstrom Herasafe	Thermo Fisher Scientific
Mikrokühlzentrifuge Heraeus Fresco 21	Thermo Fisher Scientific
Mikroplattenleser Mithras LB 940	Berthold Technologies
Multitechnologie	
Mikrowelle HMT72M420	Bosch (Stuttgart, Deutschland)
Mixer Vortex-Genie 2	Scientific Industries (Bohemia, USA)
Multifunktionsmikroskop MBL2000	Krüss (Hamburg, Deutschland)
Oberschalenwaage Scout II	Ohaus (Bradford, USA)
Photometer für Mikrotiterplatten Spector Mini I mit Programm Easy Win Fitting	Tecan (Männedorf, Schweiz)
Realtime PCR System Step One Plus mit StepOne Software (Version 2.1)	Life Technologies
Rollschüttler The Coulter Mixer	Coulter Electronics (Hertfordshire, Großbritannien)
Spectrophotometer Nanodrop 2000c	Thermo Fisher Scientific
Stromversorger Power Pac Basic	Bio-Rad Laboratories
Tank-Transfer-Einheit	Bio-Rad Laboratories
Thermomixer compact	Eppendorf AG
Thermozykler T3000	Biometra (Göttingen, Deutschland)
Tiefkühlschrank Forma -80°C	Thermo Fisher Scientific
Tiefkühlschrank Premium -20°C	Liebherr (Biberach, Deutschland)
UV-Leuchttisch mit Videosystem Biovison	Peqlab
Wärme- und Trockenofen	Thermo Fisher Scientific
Wasserbad Isotemp 210	Thermo Fisher Scientific
Werkbank für Nukleinsäurearbeiten Captair bio	Erlab (Val de Reuil Cedex, Frankreich)

### 3.3 Puffer und Lösungen

Elektrophorese-Laufpuffer (10fach konzentriert)	144 g Glycin 30 g TRIS 10 g SDS <i>ad 1 l mit Aqua dest.</i>
---	---

Elektroporationspuffer	90 mM NaPO <sub>4</sub> 10 mM MgCl <sub>2</sub> 50 mM Glukose pH 7,2
Ladepuffer für DNA (6x)	50% Glycerin 10 mM EDTA 0,25% Bromphenolblau
PBS	200 mg/l KCl 200 mg/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 8,0 g/l NaCl 1,15 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
PBS/BSA	PBS 5 g/l BSA
PBS/Tween	PBS 0,05% Tween 20
Ponceau-Färbelösung	0,1% Ponceau S 5% Essigsäure in <i>Aqua dest.</i>
<i>Resolving</i> -Puffer	181,5 g TRIS 240 ml 1 M Salzsäure 260 ml <i>Aqua dest.</i>
Sammelgel	600 µl 30% Acrylamid/ 1,5% Bisacrylamid (37,5:1) 250 µl <i>Spacer</i> -Puffer 25 µl 10% SDS 1,5 ml 8 M Harnstoff 75 µl Ammoniumpersulfat (10%) 2,5 µl Tetramethylethyldiamin
<i>Spacer</i> -Puffer	36,6 g TRIS pH: 6,7 (mit Phosphorsäure eingestellt) <i>ad</i> 500 ml mit <i>Aqua dest.</i>
<i>Strip</i> -Puffer	10 ml SDS 20% 3,085 ml TRIS 2 M 86,9 ml <i>Aqua dest.</i>
<i>Super optimal broth with catabolite repression</i> (SOC)-Medium	LB-Medium nach Lennox 20 mM Glukose 20 mM MgCl <sub>2</sub>
TAE-Puffer	4,9 g/l TRIS 370 mg/l EDTA 1,2 g/l Natriumacetat
Transferpuffer	3,03 g TRIS

	14,4 g Glycin 200 ml Methanol <i>ad 1 l mit Aqua dest.</i>
Trenngel (7%)	2,9 ml 25% Acrylamid 2,3 ml <i>Aqua dest.</i> 2,0 ml <i>Resolving</i> -Puffer 100 µl 10% SDS 3,0 ml 8 M Harnstoff 225 µl 3% Ammoniumpersulfat 10 µl Tetramethylethylendiamin
Western-Blot-Probenpuffer	5,0 ml 8 M Harnstoff 2,0 ml <i>Spacer</i> -Puffer 1,0 ml 20% SDS 500 µl β-Mercaptoethanol 1,5 ml Glycerin 0,06% Bromphenolblau

### 3.4 Zelllinien und Stämme von *Escherichia coli*

Als Modelle für Makrophagen dienten murine RAW 264.7-Zellen, die einem durch *Abelson murine leukemia virus* induzierten Tumor entstammen [141], sowie humane U937-Zellen, deren Ursprung ein histiozytisches Lymphom ist [142].

Zelllysate von primären CD14<sup>+</sup> Monozyten, die *in vitro* zu Makrophagen mit einem M1- bzw. M2-Phänotyp differenziert worden waren, wurden freundlicherweise durch Dr. L. Kredel aus der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt. Die mRNA von aus dem Knochenmark von C57 black 6-Wildtyp-Mäusen isolierten und *in vitro* zu Makrophagen differenzierten Monozyten wurde freundlicherweise durch Dr. A. Batra aus der Arbeitsgruppe bereitgestellt.

Für die Vermehrung von Plasmid-DNA sowie für die *in vitro*-Mutagenese wurden die *E. coli*-Stämme TOP 10 (Genotyp: F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1 λ; Invitrogen) bzw. XL1-blue (Genotyp: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac[FproAB lacIqΔM15Tn10(Tetr); Stratagene, La Jolla, USA) verwendet.

Alle Arbeiten der Sicherheitsstufe 1 nach Gentechnik-Gesetz/-Sicherheitsverordnung wurden in der gentechnischen Anlage der Medizinischen Klinik für Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie am Campus BenjaminFranklin (Aktenzeichen: VC II2-21/91) durchgeführt.

### 3.5 Zellkulturmedien

U937-Medium	500 ml Zellkulturmedium Roswell Park Memorial Institute 1640 mit 1,8 g/l Glukose, 35 mM HEPES 10% FCS 1 mM Natriumpyruvat 2 mM L-Glutamin
RAW 264.7-Medium	500 ml Zellkulturmedium Dulbecco's Modified Eagle mit 4,5 g/l Glucose 25 mM HEPES 10% FCS 1 mM Natriumpyruvat 2 mM L-Glutamin

### 3.6 Murine rekombinante Proteine

Alle rekombinanten Proteine waren in *E. coli* hergestellt und wurden in *Aqua dest.* gelöst.

Protein	Spezifische Aktivität (U/mg)	Hersteller
TNF $\alpha$	$>1 \times 10^7$	Peprtech (Rocky Hill, USA)
GM-CSF	$>2 \times 10^7$	Peprtech
M-CSF	$>1 \times 10^6$	Peprtech
IL-4	(keine Angabe)	R&D Systems (Minneapolis, USA)
IL-6	$>5 \times 10^7$	Peprtech
IL-13	$>2,5 \times 10^5$	Peprtech
IFN $\gamma$	$>5 \times 10^6$	Peprtech
MCP-1	(keine Angabe)	Peprtech

### 3.7 Oligonukleotide

Das aus *E. coli* abgeleitete, *E. coli*-spezifische CpG-Oligonukleotid ([A]<sub>n</sub>TGACGTT[A]<sub>n</sub>) sowie alle Primer für die PCR, die Sequenzierungen und die Mutagenesen wurden durch die Firma TIB Molbiol (Berlin, Deutschland) hergestellt. Die siRNAs wurden abgesehen von der fluoreszierenden Kontroll-siRNA, die durch Sigma-Aldrich produziert wurde, über Qiagen (Hilden, Deutschland) erworben.

## Primer für die PCR

Template	Name	Sequenz (5'→3)'	Fragment (bp)
<b>Murine Sequenzen</b>			
GAPDH	RT2GAP Fw	CATCCTgCACCACCAACTgC	286
	RT2GAP Re	ACgCCACAgCTTTCCAgAgg	
HDAC1	rtHDAC1Fo	ACCATCAAAGgACACgCCAAgT	224
	rtHDAC1Re	AAgTCCAgCAgCgAgCAACATT	
HDAC2	rtHDAC2Fo	gggCTgTgAAATTAACCGgCA	256
	rtHDAC2Re	TTCgAggATggCAAgCACAA	
HDAC3	rtHDAC3Fo	AATgAAACCTCATCgCCTggCA	242
	rtHDAC3Re	AgAAtggAAgCggCACATgTCA	
HDAC4	rtHDAC4Fo	ACTgCCCTTggAACCTgCATT	302
	rtHDAC4Re	ATgCAACTgTgCCTCAtgCTgT	
HDAC5	muHDAC5F2	ACgTTCATgCTgAAgCACCAgT	230
	muHDAC5R2	ACTTgCCgAgCAgACCAgTTT	
HDAC6	rtHDAC6Fo	ACCgTgAaggTgCCAACCTTgA	376
	rtHDAC6Re	AAAgCAgAAACCACAggCAgCA	
HDAC7	rtHDAC7Fo	TgTCACCgACCTTgCCTTCAAA	342
	rtHDAC7Re	ATCTTgCTggCTTTgCCgTgTT	
HDAC8	rtHDAC8Fo	ACgATTgCgAcggAAATTTgACCg	232
	rtHDAC8Re	TgTgCAgggACACAgTCATAACCT	
HDAC9	rtHDAC9Fo	AggATgATgATgCCTgTggTggAT	318
	rtHDAC9Re	gAgTTgTgCTTgATgCTgCCTTgT	
HDAC10	rtHDAC10Fo	AaggTgCCTgTgTTTgTCAgCTTg	340
	rtHDAC10Re	AgTgAAAaggTgTCCgggTgAAAgt	
HDAC11	rtHDAC11Fo	TCAAgtTCCTgTTTgAACgCgTGG	206
	rtHDAC11Re	TTgTCACCCATgAAgTCTCgCTCA	
<b>Humane Sequenzen</b>			
GAPDH	huGAPDH-RTF	CCTCCTgCACCACCAACTgC	286
	huGAPDH-RTR	ACgCCACAgTTTCCCgggAgg	
HDAC5	RTHDAC5For	TCTCggCTCTgCTCAgTgTA	262
	RTHDAC5Rev	CTgCACACAgCTCCAgtgTT	

### Primer für die Sequenzierung der murinen HDAC5

Name	Sequenz (5'→3')
mHDAC5Seq1-R	CAACAaggAATTCCTggAgCC
mHDAC5Seq2-F	gCAgCggCAggAggAgCTgg
mHDAC5Seq3-F	CTCCCCgAAgCTgTCAACAC
mHDAC5Seq4-F	gCCTggCCACTgTgCCTCAT
mHDAC5Seq5-F	CTgggATATTCACCATggCA

### Primer für Mutagenesen der murinen HDAC5

Name	Sequenz (5'→3')
mHDAC5-1ATGF	CTAggTACCTCCACCTgAACTCTCCCAACg
mHDAC5-1ATGR	CgTTgggAgAgTTCAggTggAggTACCTAg
mHDAC5-2ATGF	CTAggTACCTCCACCgAACTCTCCCAACgA
mHDAC5-2ATGR	TCgTTgggAgAgTTCggTggAggTACCTAg
mHDAC5H885Fo	TCTACATCTCCCTgTTTCgCTACgACAACg
mHDAC5H885Re	CgTTgTCgTAgCgAAACAgggAgATgTAgA

### siRNA für den *knock down*

Template	Name	Ziel-Sequenz (5'→3')	Markierung
Humane	Hs_HDAC5_1	CTACgACACgTTCATgCTAAA	keine
HDAC5	Hs-HDAC5_4	gCCgggTTTgATgCTgTTgAA	keine
Murine	Mm-HDAC5_2	CggCCTCggAACCCAACTTAA	keine
HDAC5	Mm-HDAC5_5	CTgggCAAgATCCTTACCAAA	keine
Kontrolle	Kontroll-siRNA	AATTCTCCGAACGTGTCACGT	keine
	fluoreszierende Kontroll-siRNA	keine Angabe	5' 6-Carboxy- fluorescein

### 3.8 Sequenzierung

Sequenzierungen erfolgten durch die Firma Seqlab (Göttingen, Deutschland) nach dem Prinzip der Fluoreszenzfarbstoff-Sequenzierung von Sanger [143]. Die Sequenzdaten wurden mit dem Programm Geneious der Firma Biomatters (Auckland, Neuseeland) ausgewertet.

### 3.9 Plasmide

Plasmid	Sequenz für	Grundvektor	Herkunft
pHDAC5	murine HDAC5 mit Hämagglutinin (HA)- <i>Tag</i>	pCMX-PL1	Ronald Evans*
pHDAC5-FS1	murine HDAC5 mit HA- <i>Tag</i> und <i>Frameshift</i> um eine Base	pCMX-PL1	<i>in-vitro</i> - Mutagenese von pHDAC5
pHDAC5-FS2	murine HDAC5 mit HA- <i>Tag</i> und <i>Frameshift</i> um zwei Basen	pCMX-PL1	<i>in-vitro</i> - Mutagenese von pHDAC5
pHDAC5 $\Delta$ HDAC	murine HDAC5 mit HA- <i>Tag</i> und Funktionsverlust der HDAC-Domäne	pCMX-PL1	<i>in-vitro</i> - Mutagenese von pHDAC5
pNFkB-Luc	Luciferase unter der Kontrolle des NFkB-Promotors	pGL4.10	Sigma Aldrich
pEGFP	grün fluoreszierendes Protein (GFP)	pEGFP-N1	Clontech Laboratories (Mountain View, USA)
pHDAC5-YFP	humane HDAC5 mit gelb fluoreszierendem Protein (YFP) als <i>Tag</i>	pcDNA 3.1	Ronald Evans*

\*Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit als pHDAC5 bzw. pHDAC5-YFP bezeichneten Plasmide wurden freundlicherweise durch Ronald Evans vom Salk Institute (San Diego, USA) zur Verfügung gestellt.

### 3.10 Antikörper

#### Primärantikörper

Antigen	Herkunft,	Subtyp	Klon	Hersteller	Bezeichnung
HDAC5	Kaninchen	IgG	polyklonal	Cell Signaling Technology (Danvers, USA)	Anti-HDAC5
$\beta$ -Actin	Maus	IgG	AC15	Sigma-Aldrich	Anti- $\beta$ -Aktin
HA	Maus	IgG	6E2	Cell Signaling Technology	Anti-HA

#### Sekundärantikörper

Antigen	Herkunft,	Subtyp	Klon	Hersteller	Bezeichnung
Kaninchen IgG	Ziege	IgG	polyklonal	DAKO (Glostrup, Dänemark)	Anti- Kaninchen
Maus IgG	Kaninchen	IgG	polyklonal	DAKO	Anti-Maus

Alle Sekundärantikörper waren mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert.

### 3.11 Transformation von *Escherichia coli*

Als Transformation wird die nicht virale Aufnahme von DNA in kompetente Bakterien bezeichnet [144]. Transformierte Bakterien können durch Kultur auf Antibiotika-enthaltenden Agarplatten aufgrund der durch das Plasmid erworbenen Antibiotikaresistenz selektiert werden [145]. *E. coli* kommen in der Natur nicht als kompetente Bakterien vor, können jedoch durch eine chemische Vorbehandlung kompetent gemacht werden [146].

Für die Transformation wurden 30  $\mu$ l Bakteriensuspension kompetenter *E. coli* TOP 10 auf Eis aufgetaut, mit bis zu 2,2  $\mu$ g Plasmid vermischt und für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien einem Hitzeschock von 42°C für 90 s bei 350 rpm ausgesetzt und danach sofort für 2 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 250  $\mu$ l SOC-Medium wurde der Gesamtansatz für eine Stunde bei 37°C und 300 rpm inkubiert. Von jedem Transformationsansatz wurden 100  $\mu$ l auf eine LB-Agarplatte mit 100  $\mu$ g/ml Ampicillin und 20  $\mu$ l auf eine LB-Agarplatte ohne Ampicillin plattiert und diese über Nacht bei 37°C inkubiert. Für das *Screening* wurden

Einzelkolonien in jeweils 2 ml LB-Medium nach Lennox über Nacht bei 37°C und unter Schütteln bei 200 rpm herangezogen. Zur Vermehrung von Plasmid-DNA in größerem Maßstab wurden zunächst 12 ml LB-Medium nach Lennox mit einer Einzelkolonie beimpft und wie beschrieben über acht Stunden inkubiert. Aus dieser Vorkultur wurde 1 ml entnommen, in 200 ml LB-Medium nach Lennox überführt und nochmals über Nacht kultiviert.

### **3.12 Plasmid-DNA-Präparation**

Nach alkalischer Lyse von transformierten Bakterien kann die chromosomale DNA durch Zusatz von Kaliumacetat ausgefällt und die Plasmid-DNA durch Bindung an eine Silikatmembran aufgereinigt werden [147].

Die Präparation von bis zu 20 µg bzw. 500 µg DNA-Plasmid erfolgte mit Hilfe von Plasmid-Präparationskits für Mini- oder Maxipräparation nach den Angaben des Herstellers. Die isolierte Plasmid-DNA wurde mit *Aqua dest.* eluiert, ggf. aliquotiert und bei -20°C gelagert.

### **3.13 DNA-Spaltung mit Restriktionsenzymen**

Mithilfe bakterieller Restriktionsendonukleasen kann doppelsträngige DNA an bestimmten, zumeist palindromen Sequenzen gespalten werden [148].

Für Kontrollspaltungen zur Analyse von DNA-Plasmiden sowie für den DpnI-Verdau nach Mutagenesen wurden 1 µg DNA, eine Einheit der entsprechenden Restriktionsendonuklease und 2 µl des für das Enzym bzw. die Enzyme optimalen 10fach konzentrierten Reaktionspuffers in einem Gesamtvolumen von 20 µl 1,5 Stunden bei 37°C in einem Wärmeofen inkubiert.

Der KpnI-Verdau zur Präparation eines Plasmid-Standards für die quantitative Realtime-PCR wurde mit 50 µg DNA, zehn Einheiten Restriktionsendonuklease und 20 µl des entsprechenden 10fach konzentrierten Reaktionspuffers in einem Gesamtvolumen von 200 µl für zwei Stunden bei 37°C in einem Wärmeofen durchgeführt. Die Reaktionen wurden jeweils durch eine temperaturabhängige Inaktivierung des Enzyms in einem Thermomixer bei 65°C für 10 min beendet. Zur Kontrolle der Spaltungsreaktionen erfolgte eine Gelelektrophorese.

### **3.14 Agarose-Gelelektrophorese**

Im elektrischen Feld wandern Nucleinsäuren bei neutralem pH aufgrund ihrer negativen Ladung zur Anode. Die netzartige Molekülstruktur eines Agarose-Gels behindert den elektrophoretischen Transport je nach Größe der Nucleinsäure mehr oder weniger stark. Auf diese Weise können Nucleinsäuren nach ihrer Größe aufgetrennt und durch einen mitgeführten Längenstandard abgeschätzt werden [146]. Aufgetrennte Nucleinsäurebanden werden mit Hilfe von Ethidiumbromid sichtbar gemacht, dessen Absorptionsspektrum sich durch Interkalation in Nucleinsäuren im ultravioletten Bereich verändert [149].

Für die DNA-Gelelektrophorese wurde 1 g Agarose eingewogen und mit 100 ml TAE-Puffer in einer Mikrowelle aufgekocht, bis die Agarose vollständig in Lösung gegangen war. Das flüssige Agarose-Puffer-Gemisch wurde auf einen Gelträger mit Probenkamm in der Elektrophoresekammer zur vollständigen Erhärtung überführt. Anschließend wurde das Gel mit TAE-Puffer überschichtet und der Probenkamm entfernt. Für eine Kontrollelektrophorese wurden 20 µl DNA-Lösung mit 4 µl des Ladepuffers für DNA gemischt und 18 µl dieses Gemisches in die Probenaschen des Gels übertragen. Zur relativen Größenbestimmung wurden 12 µl eines DNA-Größenstandards mitgeführt. Die Elektrophorese erfolgte in TAE-Puffer bei 6-8 V/cm bis 2/3 der gesamten Laufstrecke erreicht wurden. Anschließend wurde das Gel in einer Färbelösung mit 1 µg/ml Ethidiumbromid in TAE-Puffer inkubiert. Die aufgetrennten Nucleinsäuren wurden mithilfe eines UV-Leuchttisches sichtbar gemacht und durch ein Videosystem dokumentiert.

### **3.15 Nucleinsäure-Fragmentisolierung aus Agarosegelen**

Nach geelktrophoretischer Auftrennung können Nucleinsäuren mit Hilfe jodhaltiger Puffer aus dem Agarosegel gelöst und anschließend durch Bindung an Silicatmembranen aufgereinigt werden [150].

In einem Gesamtvolumen von 200 µl wurden 50 µg einer durch Restriktionsendonucleasen gespaltene Plasmid-DNA mit 40 µl des Ladepuffers für DNA vermischt. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte in einer mit 20% Ethanol gereinigten Elektrophoresekammer in einem Agarosegel mit einer Konzentration von 0,8%. Das zu isolierende Nucleinsäurefragment wurde auf dem UV-Leuchttisch sichtbar gemacht und das Gelstück mit einem Skalpel

ausgeschnitten. Die Gelexzitate wurden in ein eingewogenes 15 ml Reaktionsgefäß transferiert und deren Masse durch Wiegen bestimmt. Die DNA wurde mithilfe eines Gelextraktionskits nach den Angaben des Herstellers extrahiert und jede Säule mit 30 µl *Aqua dest.* eluiert. Die Reinheit der DNA wurde mithilfe einer Gelelektrophorese kontrolliert und die Konzentration spektrophotometrisch bestimmt. Anschließend wurden die extrahierten Nukleinsäurefragmente aliquotiert und bei -20°C gelagert.

### **3.16 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen**

Die Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren kann mithilfe eines Spektrophotometers anhand der spezifischen Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt werden [146].

Für Konzentrationsbestimmungen wurden 2 µl der jeweiligen Nukleinsäure-Lösung nach Kalibrierung des Gerätes mit *Aqua dest.* spektrophotometrisch untersucht. Eine hinreichende Reinheit wurde nur angenommen, wenn ein Quotient der Absorption bei 260 nm zu der bei 280 nm von 1,8 für DNA bzw. 1,9 für Ribonukleinsäure (RNA) nicht unterschritten wurde.

### **3.17 Zellkultur**

RAW 264.7-Zellen wachsen als adhärenente Zellen *in vitro* zu einem einschichtigen Zellrasen heran, der fest an der Oberfläche der Kulturmaterialien haftet [141]. U937-Zellen liegen suspendiert im Medium vor [142]. Trypanblau reichert sich bei toten Zellen aufgrund der erhöhten Membrandurchlässigkeit im Zellplasma an und führt somit zu einer blauen Färbung dieser Zellen. Vitale Zellen weisen hingegen keine Färbung auf und können unter einem Lichtmikroskop ausgezählt werden [151].

Alle Zellkulturarbeiten wurden keimarm in einer Sicherheitswerkbank mit laminärer Strömung durchgeführt. Die Kultur der Zellen erfolgte in einem Begasungsbrutschrank bei 37°C und 6% CO<sub>2</sub> in wasserdampfgesättigter Atmosphäre. Das für die Zellkultur-Medien verwendete FCS wurde zur Inaktivierung der Komplementfaktoren 30 min bei 56°C erhitzt und anschließend bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Um optimale Kulturbedingungen zu sichern, wurden die RAW 264.7-Zellen in eine neue Kulturflasche überführt, bevor der Zellrasen etwa 80% des Kulturgefäßes bedeckte; U937-Zellen bei Zelldichten von maximal 1x10<sup>6</sup>/ml. Beide Zelllinien wurden alle zwei bis drei Tage passagiert. Das Ablösen der

RAW 264.7-Zellen erfolgte mit Hilfe eines Zellscrapers. Die Zellzahl sowie die Zellvitalität der abgelösten RAW 264.7- bzw. der U937-Zellen aus der Kultur wurden nach Mischen von 20 µl Zellsuspension mit 20 µl Trypanblaulösung mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Suspensionen wurden bei 398 g für 7 min zentrifugiert, das verbrauchte Zellmedium verworfen und die Zellen in frischem Nährmedium mit einer Dichte von  $1,6 \cdot 10^4$ /ml aufgenommen.

### **3.18 Inkubation von RAW 264.7- und U937-Zellen mit Proteinen und bakteriellem Lipopolysaccharid**

Für die Inkubation mit Proteinen wurden RAW 264.7- und U937-Zellen durch Passagieren synchronisiert [152].

Die Zellen wurden mit einer Dichte von  $1 \cdot 10^6$ /ml in frischem Medium mit der angegebenen Konzentration des jeweiligen Proteins in Zellkulturplatten mit 6 bzw. 12 Vertiefungen ausgesät. Bei Kinetiken wurden alle Ansätze gleichzeitig in die Kulturplatten überführt, jedoch zu unterschiedlichen Zeitpunkten stimuliert, um eine identische Kulturzeit in den Zellkulturplatten für alle Ansätze sicherzustellen.

### **3.19 Transfektion eukaryontischer Zellen durch Elektroporation**

Starke elektrische Felder führen zu einer physikalischen Störung der Integrität biologischer Membranen. Durch so entstandene Poren können Makromoleküle von außen in die Zelle gelangen. Die Effektivität der Transfektion ist dabei von der Feldstärke des angelegten elektrischen Feldes und der Zeitdauer abhängig, die die Zellen dem elektrischen Feld ausgesetzt werden. Eukaryontische Zellen können effektiv durch Rechteckpulse transfiziert werden. Eine Kombination von zwei Strompulsen verzögert den Verschluss der Membranporen. Folgen die Rechteckpulse unterbrechungsfrei aufeinander, wird die eingeschleuste DNA-Menge gesteigert. Auf diese Weise können DNA-Plasmide oder siRNA effektiv in den Zellkern eukaryontischer Zellen eingebracht werden [153].

Für die Elektroporation wurden  $1 \cdot 10^6$  Zellen aus einer am Tage zuvor passagierten Standardkultur in ein Reaktionsgefäß überführt und für 7 min bei 398 g und 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl Elektroporationspuffer resuspendiert und anschließend das entsprechende Plasmid bzw. die siRNA hinzugefügt. Der Gesamtansatz wurde gut durchmischt, in eine Elektroporationsküvette mit 2 mm

Spaltbreite überführt und mit Hilfe des Elektroporators einem bzw. einer kontinuierlichen Kombination zweier Strompulse ausgesetzt. Danach wurden die Zellen sofort in 4 ml des entsprechenden vorgewärmten Standardmediums in einer 6-Well-Zellkulturplatte überführt und bei 37°C und 6% CO<sub>2</sub>-Sättigung kultiviert.

### **3.20 Ribonukleinsäure-Isolation aus Zelllysaten**

RNA aus Zellenlysaten wurde durch Aufreinigung über Silicatmembranen isoliert [154].

Die Aufreinigung der mRNA erfolgte mit einem entsprechenden Kit nach den Angaben des Herstellers inklusive des optionalen Verdauens genomischer DNA mit einer RNase-freien DNase. Für die Isolation von RNA wurden die Zellen zunächst mit 10 ml PBS gewaschen, gezählt und anschließend in 350 µl RLT-Puffer mit 1% Mercaptoethanol lysiert. Die Lysate wurden bei -80°C bis zur Isolation der mRNA eingefroren.

### **3.21 Reverse Transkription**

Reverse Transkriptasen sind RNA-abhängige DNA-Polymerasen, die RNA in DNA umschreiben [155]. Der entstandene DNA-Doppelstrang kann als Matrize für eine PCR verwendet werden [156].

Für reverse Transkriptionen wurden 500 ng RNA in einem Volumen von 20 µl mit *Aqua dest.* gelöst. Nach Zugabe von 2 µl DNase I und 2,5 µl 10fach konzentriertem DNase I-Puffer wurden die Proben in einem Thermocycler 15 min bei 22°C inkubiert. In der Lösung befindliche Magnesiumionen wurden durch 2,5 µl EDTA gebunden. Die Inaktivierung der DNase erfolgte durch Denaturierung bei 65 °C für 10 min. Anschließend wurden 20,5 µl *Aqua dest.*, 2 µl Oligo-dT-Primer und 4 µl 10 mM dNTPs hinzugefügt und der Gesamtansatz für 5 min bei 65°C denaturiert. Nach Addition von 1 µl RNase OUT sowie 8 µl 100 mM Dithiothreitol wurden 16 µl *First strand*-Puffer hinzugegeben und der Gesamtansatz 2 min bei 37°C inkubiert. Im letzten Schritt wurden zu jedem Ansatz 2 µl der *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase* hinzugefügt. Die komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA)-Synthese erfolgte bei 37°C für 50 min. Anschließend wurde die reverse Transkriptase durch Inkubation bei 70°C für 15 min inaktiviert. Die entstandene cDNA wurde bei 4°C gelagert.

## 3.22 Polymerasekettenreaktion

### 3.22.1 Prinzip

Mithilfe einer temperaturbeständigen DNA-Polymerase vermehrt die PCR definierte DNA-Abschnitt, die durch spezifische Primer am 5'- und 3'-Ende eingegrenzt sind [157]. Die PCR erfolgt in Zyklen, die jeweils aus den folgenden Schritten bestehen:

Denaturierung	DNA-Doppelstränge werden getrennt. (Aufhebung der Wasserstoffbrückenbindungen mittels Hitze)
<i>Annealing</i>	Spezifische Primer hybridisieren mit Einzelsträngen. (optimale Temperatur 5-10°C unterhalb der Schmelztemperatur der Primer, die von Länge und Passgenauigkeit der Sequenzen abhängt; zu niedrige Temperatur begünstigt Anlagerung auch an nicht komplementären DNA-Sequenzen; zu hohe Temperatur verhindert Primer-Bindung)
Elongation	Komplementärer DNA-Strang wird an Einzelstrangmatrizen synthetisiert. (Beginn am 3'-Ende der Primer, die optimale Temperatur ist von der gewählten Polymerase abhängig)

Die initiale Denaturierung ist im Vergleich zu den Denaturierungen in den einzelnen PCR-Zyklen verlängert, um eine vollständige Auftrennung der DNA-Doppelstränge zu Beginn der Reaktion sicherzustellen. Zum Abschluss der Reaktion erfolgt die *Final Extension*, bei der ein überhängender Adenosin-Rest an die 3'-Enden der DNA synthetisiert wird [158].

Die PCR wurde zum Nachweis der HDAC5 und GAPDH in murinen und humanen Makrophagen, zum Nachweis von Mykoplasmen-DNA in kultivierten Zellen sowie zur ortsgerechten Mutagenese verwendet.

### 3.22.2 Nachweis von Mykoplasmen-DNA in Zellkulturen

Infektionen mit Mykoplasmen sind bei längerer Kultur von Zellen *in vitro* häufig. Die intra- und extrazellulären, parasitären Bakterien interagieren mit den Wirtszellen durch Verminderung der Nährstoff-Konzentration im Medium [159] sowie durch direkte Stimulation über TLR [160]. Daher sind regelmäßige Kontrollen der

Zellkulturen beispielsweise durch spezifische Amplifikation von Mykoplasmen-DNA mittels PCR für die Erhebung valider Daten zwingend notwendig.

Für den Nachweis spezifischer Mykoplasmen-DNA in kultivierten Zellen wurden  $1 \times 10^5$  Zellen aus der Kultur entnommen, 7 min bei 398 g und 4°C abzentrifugiert, mit 1 ml PBS gewaschen, erneut zentrifugiert und in 100 µl PBS resuspendiert. Der Gesamtansatz wurde 10 min bei 95°C und 350 rpm erhitzt und anschließend 2 min bei 16200 g zentrifugiert. Aus dem Überstand wurden 10 µl in ein vorgefertigtes Reaktionsgefäß des Kits überführt und 10 µl *Aqua dest.* hinzugefügt. Als Positivkontrollen dienten eine im Kit enthaltene DNA-Lösung sowie eine vorbekannte positive Probe. Als Negativkontrolle wurde *Aqua dest.* verwendet. Die PCR wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

Reaktionsschritt	Temperatur (°C)	Dauer (s)	Zyklen
Initiale Denaturierung	94	60	1
Amplifikation			39
Denaturierung	94	30	
<i>Annealing</i>	58-62	20	
Elongation	72	60	
<i>Final Extension</i>	72	300	1

Die amplifizierte DNA wurde durch Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels UV-Leuchttisch sichtbar gemacht.

### 3.22.3 Standard-PCR

Durch Kombination von reverser Transkription und PCR kann die Expression spezifischer Gene auf Transkriptionsebene durch die Amplifikation geringster Nukleinsäure-Mengen sehr sensitiv nachgewiesen werden [161].

Dieses Verfahren wurde zum Nachweis der HDAC5 und GAPDH in humanen und murinen Makrophagen durchgeführt. Als Template in der PCR dienten 2 µl cDNA aus der reversen Transkription. Für die Amplifikation wurden die DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* und die spezifischen Primer für HDAC5 und GAPDH verwendet. Die PCR wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

Reaktionsschritt	Temperatur (°C)	Dauer (s)	Zyklen
Initiale Denaturierung	94	180	1
Amplifikation			40
Denaturierung	94	45	
<i>Annealing</i>	55	30	
Elongation	72	180	
<i>Final Extension</i>	72	600	1

Nach Amplifikation wurde die DNA durch Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels UV-Leuchttisch sichtbar gemacht.

### 3.22.4 Ortsgerichtete Mutagenese

Durch ortsgerechte Mutagenesen können gezielt Basen in einer Matrize, wie z.B. einem Expressionsplasmid ausgetauscht (Substitution), eingefügt (Insertion) oder entfernt (Deletion) werden. Dazu werden in einer PCR-Reaktion sequenzspezifische *Forward*- und *Reverse*-Primer, die die gewünschte Veränderung der Basenfolge enthalten, sowie eine DNA-Polymerase mit möglichst geringer Fehlerrate verwendet. Erfolgt die Mutagenese in einer aus Bakterien gewonnenen Plasmid-DNA, kann durch einen methylierungsabhängigen DpnI-Verdau die DNA der Ursprungsplasmide selektiv abgebaut werden. Die *in vitro* synthetisierte DNA mit der eingeführten Mutation kann in Bakterien transformiert werden, die die DNA ligieren und amplifizieren [162].

Zur Mutagenese des mHDAC5-HA-Plasmides wurden eine hitzestabile DNA-Polymerase mit einer Fehlerrate von  $1/3,6 \times 10^6$  sowie die für die Mutagenese der HDAC5 ausgewählten Primerpaare mHDAC5-1ATGF/mHDAC5-1ATGR, mHDAC5-2ATGF/mHDAC5-2ATGR bzw. mHDAC5H885Fo/mHDAC5H885Re verwendet. Als Matrize dienten 10 ng Plasmid-DNA in einem Gesamtansatz von 50 µl. Die PCR wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

Reaktionsschritt	Temperatur (°C)	Dauer (s)	Zyklen
Initiale Denaturierung	94	120	1
Amplifikation			25
Denaturierung	98	20	
<i>Annealing</i>	62	20	
Elongation	72	60	
<i>Final Extension</i>	72	300	1

Nach Restriktionsspaltung des Amplifikates mit DpnI wurden 5 µl aus dem Verdau in 50 µl kompetente *E. coli* XL1 transformiert. Nach Präparation der Plasmid-DNA wurde der Erfolg der Mutagenesen mittels Sequenzierung kontrolliert.

### 3.22.5 Quantitative Realtime-PCR

Die quantitative Realtime-Polymerasekettenreaktion (qPCR) ermöglicht die Quantifizierung synthetisierter DNA mithilfe fluoreszierender Farbstoffe, die mit doppelsträngiger DNA interkalieren und dabei ihre Fluoreszenzintensität steigern [163]. Der *crossing point* (Ct) gibt die Anzahl an PCR-Zyklen an, bei der ein bestimmtes Fluoreszenzniveau detektiert wird [164]. Die Genexpression ist in Relation zu einem *Housekeeping-Gen* und als mRNA-Kopienzahl pro Zelle mit Hilfe eines quantitativen DNA-Standards des Zielgens messbar.

Für relative quantitative Bestimmungen wurde die  $\Delta\Delta Ct$ -Methode mit GAPDH als *Housekeeping-Gen* verwendet [165]. Mit Hilfe dieser Methode können relative Veränderungen eines Zielgens von stimulierten Zellen im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen angegeben werden. Dazu wird der mittlere Ct ( $Ct_{\text{mean}}$ ) des *Housekeeping-Gen* der jeweiligen Probe von dem Ct des Zielgens derselben Probe subtrahiert:

$$Ct_{\text{mean}}(\text{HDAC5}) - Ct_{\text{mean}}(\text{GAPDH}) = \Delta Ct$$

Bei Triplets mit Doppelbestimmungen wurde eine Standardabweichung des  $Ct_{\text{mean}}$  von 10% toleriert.

Anschließend werden die gemittelten  $\Delta Ct$ -Werte von unstimulierten Zellen (Kontrollen) von den  $\Delta Ct$ -Werten der stimulierten Zellen (Probe) subtrahiert:

$$\Delta Ct(\text{Probe}) - \Delta Ct(\text{Kontrollen}) = \Delta\Delta Ct$$

Die relative Expression des Zielgens in den Proben im Vergleich zu der Expression des Zielgens in den Kontrollen kann durch die folgende Formel angegeben werden:

$$2^{-\Delta\Delta Ct} \times 100 = \text{Relative Expression des Zielgens [\%]}$$

Für die absolute quantitative Bestimmung der mRNA-Kopien pro Zelle kann eine DNA bekannter Sequenz, wie z.B. ein Plasmid mit der klonierten spezifischen cDNA als quantitativer DNA-Standard des Zielgens verwendet werden. Anhand der Kenntnis der Basenabfolge des Plasmids kann dessen Molekulargewicht berechnet werden, indem die Anzahl der bp mit dem durchschnittlichen Molekulargewicht einer Base (330 g/mol) multipliziert wird. Der Faktor zwei berücksichtigt den DNA-Doppelstrang:

$$\text{Anzahl der Basenpaare} \times 330 \times 2 = \text{Molekulargewicht}$$

Durch Division des Molekulargewichtes des Plasmids durch die Avogadro-Zahl kann das Gewicht eines linearisierten Plasmid-Moleküls berechnet werden:

$$\frac{\text{Molekulargewicht des Plasmids}}{\text{Avogadrozahl}} = \frac{\text{Masse}}{\text{Plasmid-Molekül}}$$

Die Division von 1 µg durch die Masse eines Plasmidmoleküls ergibt die Anzahl der Moleküle Plasmid, die in einem Mikrogramm Plasmid enthalten sind:

$$\frac{0,000001}{\text{Masse eines Plasmidmoleküls}} = \text{Plasmidmoleküle in einem Mikrogramm Plasmid}$$

Mithilfe dieser Angabe kann eine Standardverdünnungsreihe mit definierter Anzahl der Plasmid-Moleküle angelegt werden. Um die DNA-Kopienzahl pro Zelle angeben zu können, ist zudem die Kenntnis der Anzahl der verwendeten Zellen und der Konzentration der aus den Lysaten isolierten mRNA notwendig. Durch Division der Zellzahl durch das Produkt von dem Volumen des mRNA-Isolats und dessen Konzentration kann die Zellzahl pro mRNA-Masse berechnet werden:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{mRNA-Konzentration} \times \text{mRNA-Lösungsvolumen}} = \frac{\text{Zellzahl}}{\text{mRNA-Masse}}$$

Durch Multiplikation der mRNA-Masse, die für die reverse Transkription eingesetzt wurde, mit der Zellzahl pro mRNA-Masse kann nun die Zellzahl berechnet werden, die für die reverse Transkription eingesetzt wurde:

$$\text{mRNA-Masse(reverse Transkription)} \times \frac{\text{Zellzahl}}{\text{mRNA-Masse}} = \text{Zellzahl(reverse Transkription)}$$

Die Zellzahl, die für die quantitative Realtime-PCR verwendet wurde, kann durch Multiplikation der Zellzahl, die für die reverse Transkription eingesetzt wurde, mit dem Quotienten aus dem für die Realtime-PCR eingesetzten und dem gesamten Reaktionsvolumen aus der reversen Transkription berechnet werden:

$$\frac{\text{Zellzahl}(\text{reverse Transkription}) \times \text{cDNA-Volumen}(\text{Realtime-PCR})}{\text{cDNA-Volumen}(\text{reverser Transkription})} = \text{Zellzahl}(\text{Realtime-PCR})$$

Mithilfe dieser Angabe kann die DNA-Kopienzahl pro Zelle einer Probe berechnet werden:

$$\frac{\text{Kopienzahl}(\text{Realtime-PCR})}{\text{Zellzahl}(\text{Realtime-PCR})} = \text{Kopienzahl/Zelle}$$

Vor der Lyse der Zellen wurde die Zellzahl in jeder Probe ausgezählt. Für absolute Quantifizierungen der HDAC5-mRNA-Kopienzahl pro Zelle wurde durch Verdau mit KpnI linearisierte DNA von pHDAC5 als Standard verwendet, das mit einer Größe von 8.267 bp ein Molekulargewicht von 5.456.220 g/mol besitzt. Daraus ergab sich, dass in einem Mikrogramm linearisierter DNA  $1,104 \times 10^{11}$  Moleküle Plasmid enthalten waren. Mithilfe dieser Angabe wurde eine 1:10-Standardverdünnungsreihe mit  $1 \times 10^8$  Molekülen als Maximum und 10 Molekülen als Minimum angelegt.

Für die Realtime-PCR wurden pro Ansatz 6,25 µl PCR Master Mix mit 4,15 µl *Aqua dest.* und 2,5 pmol der entsprechenden *Forward*- und *Reverse*-Primer zu einem Mastermix vermischt. Für jeden Ansatz wurden 10,5 µl des Mastermixes mit 2 µl aus einem Ansatz der reversen Transkription bzw. 2 µl eines vorverdünnten Standards in Reaktionsplatten überführt. Die spezifische cDNA wurde in einem Realtime-PCR-System amplifiziert. Die PCR wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

Reaktionsschritt	Temperatur (°C)	Dauer (s)	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	600	1
Amplifikation			40
Denaturierung	95	15	
<i>Annealing</i>	60	60	
Elongation	60	60	
<i>Final Extension</i>	72	300	1

### **3.23 Durchflusszytometrie**

#### **3.23.1 Darstellung von Zellen**

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren zur Analyse von Zelleigenschaften, das auf der unterschiedlichen Reflexion und Streuung von eingestrahlttem Laserlicht in Abhängigkeit von der Größe und Granularität der Zellen beruht. Durch Transfektion in die Zelle eingeführte Fluoreszenzfarbstoffe emittieren nach Anregung durch einen Laser Licht einer bestimmten Wellenlänge. Anhand der Intensität des emittierten Lichtes der Zellen kann die Menge des intrazellulären Fluoreszenzfarbstoffes und damit die Effizienz der Transfektion beurteilt werden. Tote Zellen können mithilfe des Farbstoffs PI detektiert werden, der durch die permeable Membran diffundiert und in die DNA-Stränge interkaliert [166].

Für die Durchflusszytometrie wurden  $1 \times 10^5$  Zellen in 200  $\mu$ l PBS/BSA resuspendiert und vor der Messung 1  $\mu$ l PI-Lösung hinzugefügt. Durchflusszytometrisch wurden die Eigenschaften der PI-negativer Zellen im Vorwärts- und Seitwärts-Streulicht, sowie nach Anregung bei einer Wellenlänge von 488 nm die Fluoreszenz von YFP (Emission: 527 nm), GFP (Emission: 509 nm) und Carboxy-Fluoreszein (Emission: 517 nm) bewertet. Die Transfektionseffizienz wurde über die Fluoreszenzintensität von YFP, GFP bzw. Carboxy-Fluoreszein sowie über den Anteil fluoreszierender Zellen im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen bestimmt.

#### **3.23.2 Cytometric bead array**

Der CBA stellt eine *Bead*-basierte Form eines Immunoassays dar, durch die simultan verschiedene in Lösung befindliche Antigene bestimmt werden können. Jede *Bead*-Population mit einer definierten Fluoreszenzintensität im roten Bereich (FL3 oder FL4) hat einen anderen Zytokin- oder Chemokin-spezifischen Antikörper gebunden. Ein Phycoerythrin-konjugierter Detektionsantikörper bildet gemeinsam mit dem Antigen über den jeweiligen Primärantikörper einen Komplex, der durch die Fluoreszenz der *Bead*-Population im orangeroten Bereich (FL2) dem entsprechenden Faktor zugeordnet werden kann, wobei die Fluoreszenzintensität ein Maß für die Menge des vorhandenen Zytokins oder Chemokins ist [167].

Für den CBA zum simultanen Nachweis von IL-6, IL-10, MCP-1, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , und IL-12p70 wurden 15  $\mu$ l Zellkulturüberstand entsprechend den Vorschriften des Herstellers verwendet. Als Standard dienten 1:2-Verdünnungsreihen jedes

untersuchten Faktors mit Maxima von 5000 pg/ml und Minima von 19,53 pg/ml. Unmittelbar vor der Verwendung wurden *Pools* aus jeweils 3  $\mu$ l jeder *Bead*-Population für jeden Standard- oder Untersuchungsansatz hergestellt. Pro Ansatz wurden 15  $\mu$ l Probe, 15  $\mu$ l *Bead*-Pool sowie 15  $\mu$ l Detektionsreagenz zusammengeführt, zwei Stunden bei RT und 120 rpm auf einem Kompaktschüttler inkubiert, mit 1 ml Waschpuffer gewaschen und 4 min bei 398 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Komplexe in 70  $\mu$ l Waschpuffer resuspendiert und am Durchflusszytometer BD FACS Canto II mit der Software FACS Diva (Version 6) und der Software FCAP Array™ (Version 1) analysiert.

### 3.24 Western-Blot

Mithilfe der Western-Blot-Methode können Proteine in Zelllysaten nachgewiesen werden, indem diese gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und nach Bindung eines antigenspezifischen Antikörper mittels Chemilumineszenz detektiert werden [168-170].

Für den Western-Blot wurden die Zellen zunächst mit 10 ml PBS gewaschen, gezählt und jeweils  $3 \cdot 10^3$  Zellen in einem Mikroliter Western-Blot-Probenpuffer aufgenommen. Diese Lysate wurden bis zur Verwendung bei  $-20^\circ\text{C}$  tiefgefroren. Nach dem Auftauen wurden die Proteine durch Erhitzen für 5 min auf  $95^\circ\text{C}$  vollständig denaturiert. In jede Tasche des Sammelgels wurden Lysate von  $5 \cdot 10^4$  Zellen überführt und durch Gelelektrophorese bei 16 mA/Gel für 60-90 min in einfach-konzentriertem Elektrophorese-Laufpuffer in einer Kammer für vertikale PAGE aufgetrennt. Für den Transfer der Proteine wurde die PVDF-Membran 1 min in Methanol und anschließend wie die zwei Schwämmchen und zwei Blotfilterpapiere in Transferpuffer inkubiert. Die Teile wurden beginnend mit der Kathodenseite in folgender Reihenfolge übereinander geschichtet und in die Tank-Transfer-Einheit eingebaut: Schwämmchen – Blotfilterpapier – Gel mit getrennten Proteinen – PVDF-Membran – Blotfilterpapier – Schwämmchen.

Der Transfer erfolgte in für die Dauer der Übertragung gekühltem Transferpuffer bei 250 mA für 55 min. Die Membran wurde aus der Transfer-Einheit entnommen, in ein Färbeschälchen überführt und wie bei allen folgenden Waschschrinen zehnmal mit 10 ml PBS/Tween gewaschen. Zur Kontrolle des Transfers wurde die beladene Membran 1 min mit einer Ponceau S-Färberlösung inkubiert, um die Proteinbanden

auf der Membran sichtbar zu machen. Nach erneutem Waschen wurde die Membran in PBS/Tween mit 5% Milchpulver zwei Stunden bei Raumtemperatur und 120 rpm auf dem Kompaktschüttler inkubiert, um freie Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren. Es folgte ein weiterer Waschschrift, bevor die Membran mit 4 ml einer 1:1000-Verdünnung des antigenspezifischen ersten Antikörpers in PBS/Tween in einem 50 ml-Zentrifugenröhrchen über Nacht bei 4°C und 120 rpm auf einem Rollkippmischer inkubiert wurde. Der sekundäre Antikörper wurde nach einem erneuten Waschschrift in einer 1:2500-Verdünnung in PBS/Tween mit einem Gesamtvolumen von 10 ml auf die Membran gegeben und der Gesamtansatz für eine Stunde bei RT und 120 rpm in einem Färbeschälchen inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurde die Membran mit 1 ml Detektionsreagenz 1 min inkubiert und anschließend die Chemilumineszenz bei einer Belichtungszeit von 15 s ausgelesen. Zur Größenbestimmung der Proteinbanden wurde ein Marker mitgeführt, dessen Banden bei Auflicht, gleicher Vergrößerung und einer Belichtungszeit von 1/60 s (Iris F2.8) aufgenommen wurden. Zur Detektion eines zweiten Antigens wurde der erste Nachweiskomplex vollständig entfernt, indem die Membran mit 10 ml *Strip*-Puffer und 174,5 µl Mercaptoethanol für 5 min bei 50°C inkubiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen wurde.

In der vorliegenden Arbeit wurde neben der für HDAC 5 spezifischen Bande von ca. 124 kDa eine zusätzliche unspezifische Bande detektiert. Da allerdings in der Produktbeschreibung des Herstellers des Antikörpers eine zusätzliche unspezifische Bande in einem Western-Blot mit Lysaten aus HEK293-Zellen dargestellt ist, eine mögliche Kreuzreaktivität mit HDAC4 in größeren Mengen bereits beschrieben wurde und ähnliche unspezifische Doppelbanden mit einem anderen HDAC5-Antikörper bereits publiziert wurden [120], wurde von einer näheren Differenzierung dieser Bande abgesehen und diese Bande in allen folgenden Western-Blots vernachlässigt.

### **3.25 Enzyme-linked immunosorbent assay**

Als ELISA wird ein Antikörper-basiertes Nachweisverfahren für Proteine bezeichnet. Dabei ist ein antigenspezifischer Antikörper an einer festen Phase gebunden, der die entsprechenden Antigene aus einer Lösung immobilisiert. Bindet ein z.B. mit kovalent gebundenem Biotin markierter zweiter Antikörper über ein anderes Epitop an das gleiche Antigen, spiegelt das durch an Streptavidin gebundene Meerrettich-

Peroxidase umgesetzte chromogene Substrat die Menge des Antigens wider [171]. Der ELISA wurde zur Bestimmung der Konzentrationen von TNF $\alpha$ , IL-6 und IL-10 in Zellkulturüberständen verwendet. Alle Arbeitsschritte inklusive der jeweiligen Standardverdünnungsreihe wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Zellkulturüberstände wurden so verdünnt, dass eine Konzentrationsbestimmung des jeweiligen Proteins innerhalb des von der Standardreihe abgedeckten Konzentrationsbereiches mithilfe eines Photometers für Mikrotiterplatten möglich war.

### **3.26 Biolumineszenz zum Nachweis der Aktivierung des Nukleären Faktors- $\kappa$ B**

Durch Transfektion von Zellen mit einem Reporter-Plasmid, das für eine Luciferase-Sequenz aus *Photinus pyralis* codiert, die durch einen NF $\kappa$ B-abhängigen Promotor reguliert wird, kann die Aktivierung des NF $\kappa$ B-Signalweges durch Detektion der Biolumineszenz quantifiziert werden [172].

Zur Messung der NF $\kappa$ B-Aktivierung wurden jeweils gleiche Zellzahlen bei 398g für 7 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen. Nach zwei derartigen Waschschritten wurde der Überstand vollständig abgenommen und die Zellen in 100  $\mu$ l des im Kit enthaltenen Reporter-Lyse-Puffers mittels Einfrieren bei -80°C und anschließendem Auftauen lysiert. Die Lysate wurden bei 398 g für 1 min zentrifugiert und jeweils 20  $\mu$ l des Überstandes in eine weiße Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen überführt. Nach Zugabe von 50  $\mu$ l Lumineszenz-Substrat wurde die Biolumineszenz in *relative light units* (RLU) mittels Luminometer für 2 s gemessen.

### **3.27 Statistik**

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der Kalkulationsprogramme Excel<sup>TM</sup> der Firma Microsoft (Redmond, USA) sowie GraphPad Prism<sup>TM</sup> der Firma GraphPad Software (La Jolla, USA). Für die Berechnung von Signifikanzen zwischen zwei zu vergleichenden Gruppen wurde der Mann-Whitney-Test ohne Annahme einer Gauß'schen Normalverteilung verwendet. Waren die *p*-Werte <0,05, wurde eine Signifikanz angenommen.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Nachweis der HDAC5 in murinen und humanen Makrophagen

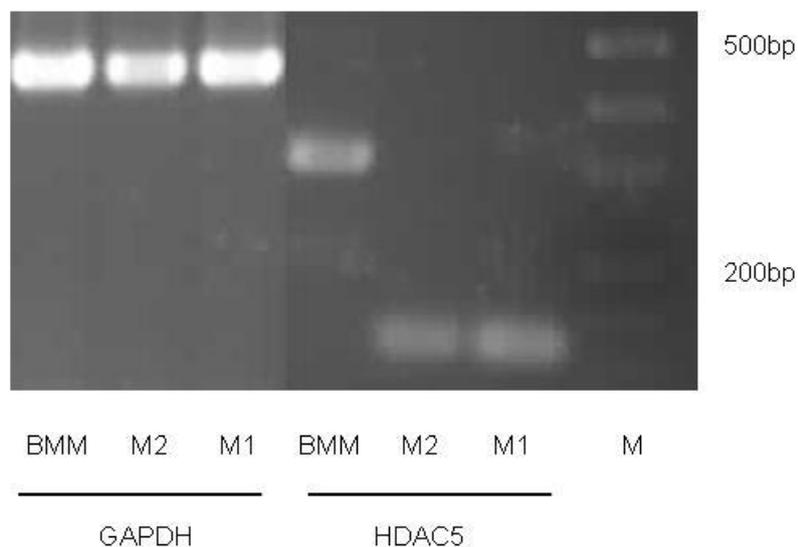
#### 4.1.1 In primären Makrophagen

Als Grundlage der weiteren Arbeit sollte zunächst nachgewiesen werden, ob HDAC5 in Makrophagen exprimiert wird und diese Expression vom Differenzierungsgrad der Zellen abhängig ist.

Dazu wurde die HDAC5-mRNA in Lysaten von aus dem Knochenmark isolierten und *in vitro* zu Makrophagen differenzierten murinen Monozyten nachgewiesen. Analog wurde die mRNA von Monozyten aus menschlichem Blut, die *in vitro* zu M1- oder M2-Makrophagen differenziert worden waren, untersucht (Abb. 1).

Die PCR aus gleichen cDNA-Mengen, die über die vergleichbare Leuchtkraft der typischen Banden für das *housekeeping*-Gen GAPDH (murin und human: 429 bp) bestätigt wurde, zeigte die erwarteten Banden von 230 bp bzw. 345 bp für murine bzw. 131 bp für die humane HDAC5. Die Differenzierung humaner Monozyten in M1- oder M2-Makrophagen hatte keinen Einfluss auf die Expressionshöhe der HDAC5.

Diese konstitutive Basisexpression war die Voraussetzung für die Modulation der HDAC5 in murinen und humanen Makrophagen.



**Abb. 1: Expression der HDAC5 in murinen und humanen Makrophagen auf mRNA-Ebene.** Die RNA von *in vitro* aus murinen Knochenmarkszellen (BMM) bzw. aus humanen peripheren CD14<sup>+</sup> Monozyten generierten Makrophagen (M1, M2) wurde isoliert, revers transkribiert und in gleichen Mengen cDNA-Fragmente

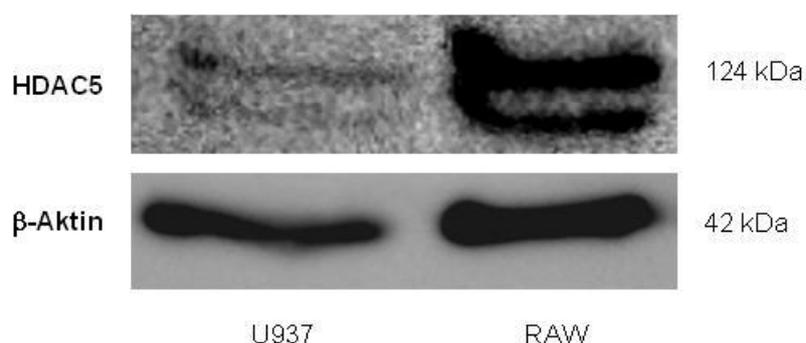
definierter Größen der HDAC5 und GAPDH mittels spezifischer Primer durch PCR amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden elektrophoretisch aufgetrennt. Das Bild ist repräsentativ für 1-2 Wiederholungen aus einem Experiment. Die Größen der PCR-Produkte sind angezeigt. (M = DNA-Längenstandard)

#### 4.1.2 In den Zelllinien U937 und RAW 264.7

Im nächsten Schritt sollte gezeigt werden, ob monozytäre Zelllinien, mit denen die Funktion der HDAC5 in Makrophagen im Rahmen dieser Arbeit systematisch untersucht werden sollte, bezogen auf die Basisexpression der HDAC5 mit primären Zellen vergleichbar sind.

Dazu wurden Zellen der murinen Makrophagen-Zelllinie RAW 264.7 sowie der humanen Monozyten-Zelllinie U937 genutzt und die Expression auf Proteinebene untersucht (Abb. 2).

Aus den Lysaten stellte sich in beiden Zelllinien eine Bande mit der erwarteten Größe von etwa 124 kDa dar. Eine weitere Bande (etwa 115 kDa) entsprach der durch den Hersteller der HDAC5-spezifischen polyklonalen Antikörperpräparation beschriebenen Bande unklarer Zuordnung [173]. Bei vergleichbarem Proteingehalt aus beiden Zelllinien, der durch die  $\beta$ -Aktin-Banden (etwa 42 kDa) nachgewiesen wurde, war das Enzym in den murinen RAW264.7-Zellen relativ stärker exprimiert als in den humanen U937-Zellen.



**Abb. 2: Nachweis der HDAC5 in murinen und humanen Makrophagenzelllinien auf Proteinebene.** RAW 264.7- sowie U937-Zellen ( $1 \times 10^5$ ) wurden lysiert und HDAC5 auf Proteinebene mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen. Der HDAC5-spezifische Antikörper wurde vollständig entfernt, bevor im zweiten Schritt  $\beta$ -Aktin ebenfalls mit einem spezifischen Antikörper wie oben beschrieben sichtbar

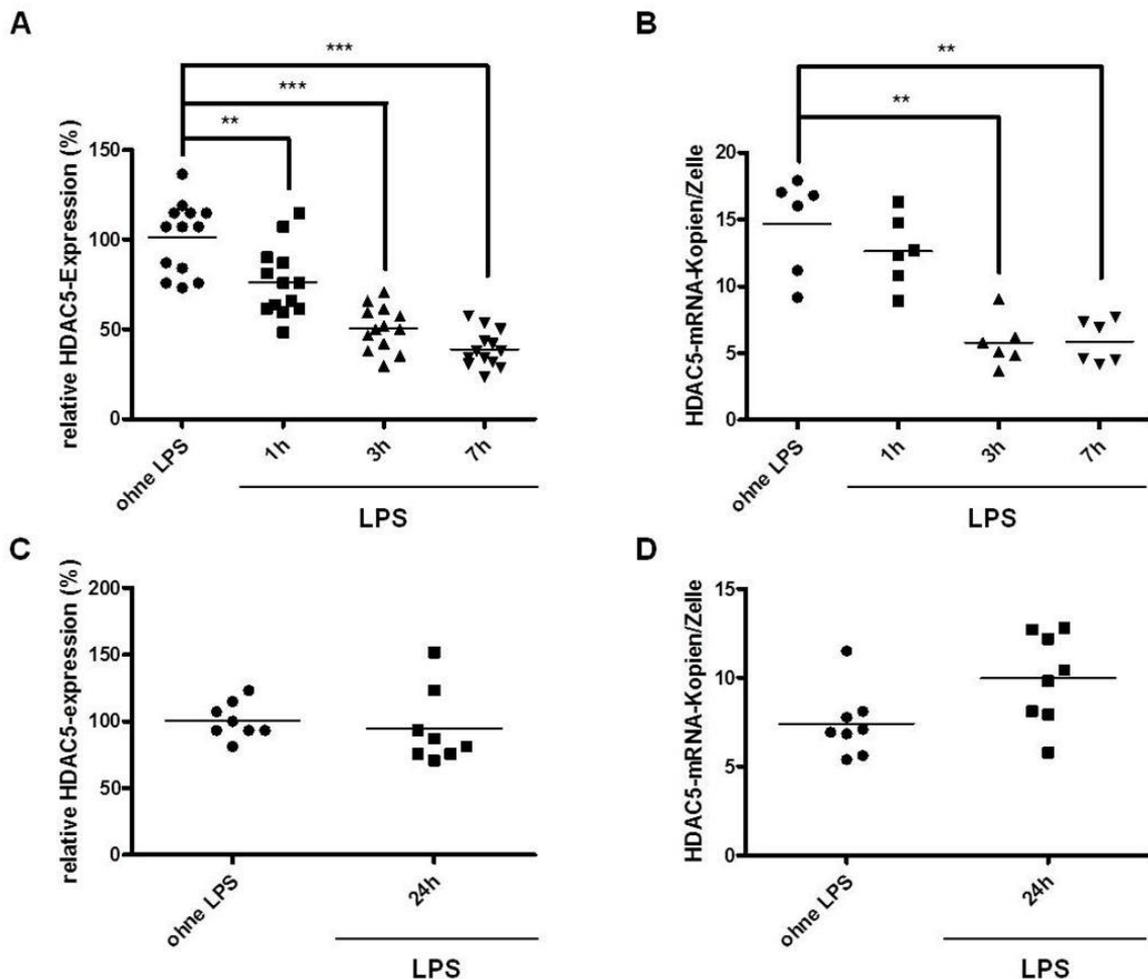
gemacht wurde. Das Bild ist repräsentativ für drei Wiederholungen aus einem Experiment.

## **4.2 Modulation der HDAC5-Expression durch pro- und anti-inflammatorische Stimuli in RAW 264.7-Zellen als Modell für murine Makrophagen**

### **4.2.1 Kinetik der Wirkung von LPS**

Der Einfluss eines inflammatorischen Milieus auf die Expression der HDAC5 in Makrophagen wurde durch Stimulation von RAW 264.7-Zellen über den TLR4 untersucht (Abb. 3).

Durch Inkubation mit LPS über einen Zeitraum bis zu sieben Stunden wurde die HDAC5-Expression in Relation zum *housekeeping*-Gen GAPDH zeitabhängig vermindert (Abb. 3A). Während sich bereits nach einer Stunde eine signifikante Reduktion um etwa 25% zeigte, war diese nach drei und sieben Stunden weiter verstärkt und lag bei etwa 50% des Ausgangswertes der HDAC5-Expression. Insbesondere bei den letzten beiden Zeitpunkten übersetzte sich dies in eine signifikant zur Basisexpression verringerte absolute mRNA-Kopienzahl pro Zelle (Abb. 3B). Nach 24 Stunden in Gegenwart von LPS normalisierte sich die HDAC5-Expression sowohl in direktem Verhältnis zur Expression der GAPDH (Abb. 3C) als auch bezogen auf die Zahl relevanter HDAC5-Kopien pro Zelle auf das Ausgangsniveau (Abb. 3D).

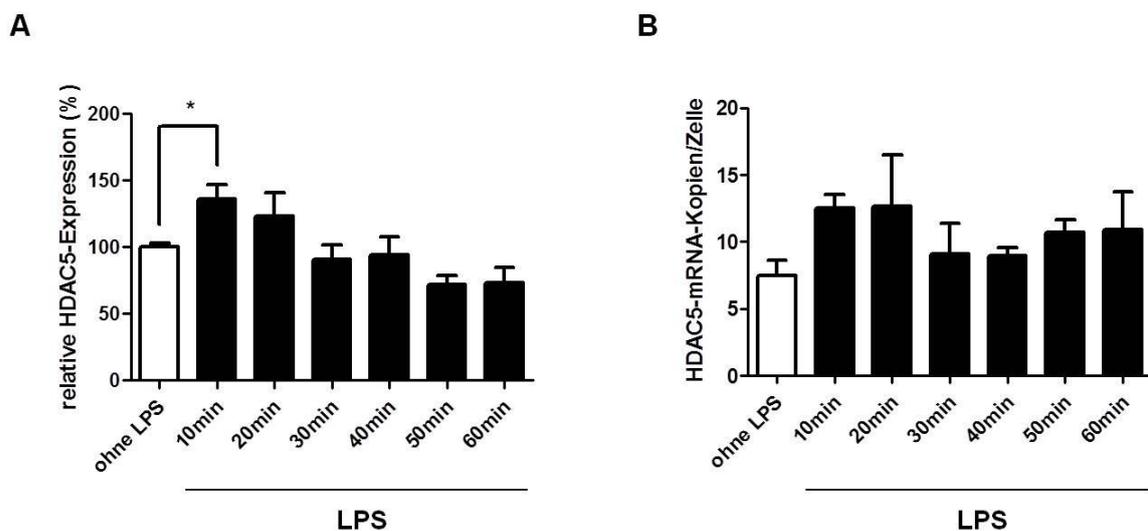


**Abb. 3: HDAC5-Expressionskinetik nach LPS-Stimulation über 7 h bzw. 24 h in RAW 264.7-Zellen.** RAW 264.7-Zellen ( $1 \times 10^6$ ) wurden über 7 (A, B) oder 24 h (C, D) ohne LPS bzw. über unterschiedliche Zeiträume mit 1  $\mu\text{g/ml}$  LPS inkubiert bevor daraus die HDAC5-mRNA nach reverser Transkription mit GAPDH- bzw. HDAC5-spezifischen Primern durch qPCR quantifiziert wurde. (A, B) Kurzzeit-Kinetik bis 7 h und (C, D) Endpunktbestimmung der HDAC5-Expression nach 24 h in Gegenwart von LPS. (A, C) HDAC5-Expression relativ zu GAPDH und (B, D) absolute Kopienzahl der HDAC5-mRNA pro Zelle. (A) Mittelwerte und Einzelwerte aus vier unabhängigen Experimenten mit  $n=3-4$  bzw. (B-D) zwei unabhängigen Experimenten mit  $n=4$ . (\*\* entspricht  $p < 0,01$ ; \*\*\* entspricht  $p < 0,001$ )

Zur Analyse frühzeitiger Veränderungen der HDAC5-Expression wurde zusätzlich eine Kinetik der TLR4-vermittelten Stimulation mit Abständen von 10 min über insgesamt 60 min durchgeführt. Nach 10 min in Gegenwart von LPS stieg die HDAC5-Expression in Bezug auf die GAPDH im Vergleich zur Kontrolle ohne LPS

um ca. 30% signifikant an (Abb. 4A). Dies blieb als Tendenz bis zu 20 min in dieser Darstellung erhalten und zeichnete sich auch in der absoluten mRNA-Quantifikation als Zunahme um ca. 6 Kopien pro Zelle nach 10 min ab (Abb. 4B). Danach fiel die HDAC5-Expression bis zum Ende der Untersuchungszeit auf das Basisniveau oder darunter (vgl. auch Abb. 3A/B).

Die Daten zur Zeitabhängigkeit des messbaren Effektes von LPS auf die HDAC5-Expression auf mRNA-Ebene deuteten auf eine sehr schnelle Kinetik und einen maximalen Effekt nach drei bis sieben Stunden hin. Daher konzentrierten sich die Untersuchungen zur Wirkung anderer Faktoren auf diesen Zeitraum.

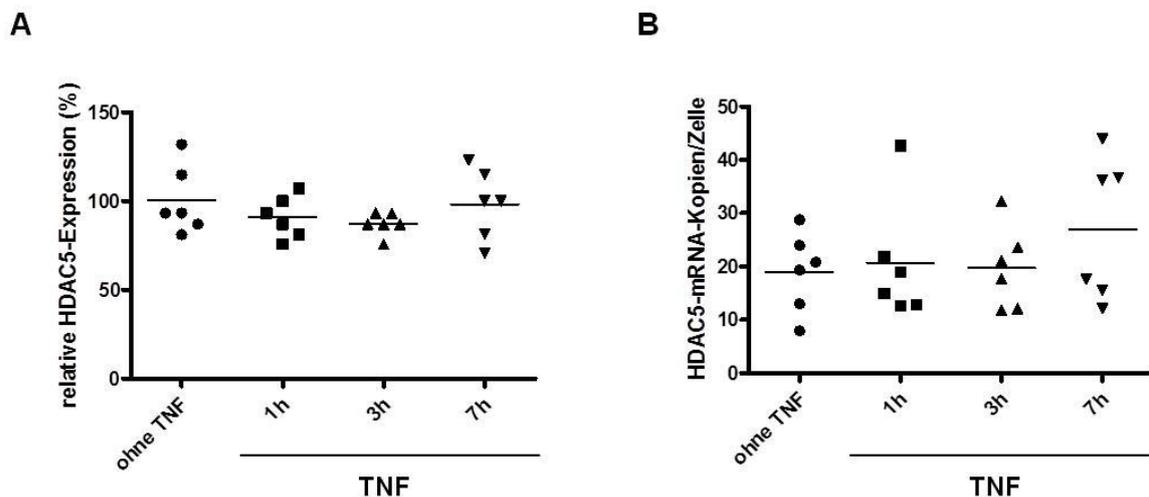


**Abb. 4: HDAC5-Expressionskinetik nach LPS-Stimulation über 60 min in RAW 264.7-Zellen.** RAW 264.7-Zellen ( $1 \times 10^6$ ) wurden 60 min ohne LPS, bzw. 10, 20, 30, 40, 50 oder 60 min mit 1  $\mu\text{g/ml}$  LPS inkubiert. Die aus mRNA revers transkribierte cDNA wurde mit GAPDH- bzw. HDAC5-spezifischen Primern durch qPCR amplifiziert. (A) HDAC5-Expression relativ zu GAPDH, (B) Absolute Kopienzahl der HDAC5-mRNA pro Zelle. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus jeweils einem Experiment mit (A)  $n=4$  bzw. (B) Duplikaten. (\* entspricht  $p < 0,05$ )

#### 4.2.2 Kurzzeit-Kinetik der Wirkung von Tumornekrosefaktor $\alpha$

Um einen möglichen Mediator der beobachteten HDAC5-Expressionsveränderungen durch LPS-Stimulation zu identifizieren, wurden RAW 264.7-Zellen bis zu sieben Stunden in Gegenwart von  $\text{TNF}\alpha$  kultiviert und die Expression der HDAC5 in diesen Zellen untersucht.

Die Inkubation mit TNF $\alpha$  erzeugte keine Veränderung der HDAC5-Expression sowohl in Relation zu GAPDH als auch in der absoluten mRNA-Kopienzahl im Vergleich zu den Kontrollen (Abb. 5). Ein Zusammenhang zwischen der Regulation der HDAC5-Expression durch Inkubation mit LPS und dem TNF $\alpha$ -Signalweg konnte somit nicht nachgewiesen werden.



**Abb. 5: HDAC5-Expressionkinetik in RAW 264.7 nach Inkubation mit TNF $\alpha$  für 7 h.** RAW 264.7-Zellen ( $1 \times 10^6$ ) wurden 7 h ohne TNF $\alpha$ , bzw. 7, 3 oder 1 h mit 5 ng/ml TNF $\alpha$  stimuliert. Aus Lysaten dieser Zellen wurde die RNA isoliert und in cDNA transkribiert. Diese wurde mithilfe HDAC5-spezifischer Primer durch qPCR analysiert. (A) HDAC5-Expression relativ zu GAPDH nach TNF $\alpha$ -Stimulation. (B) Absolute mRNA-Kopienzahl der HDAC5 pro Zelle nach TNF $\alpha$ -Stimulation. Mittelwerte und Einzelwerte aus je zwei unabhängigen Experimenten in Triplikaten

#### 4.2.3 Polarisierende, anti-inflammatorische sowie weitere pro-inflammatorische Faktoren

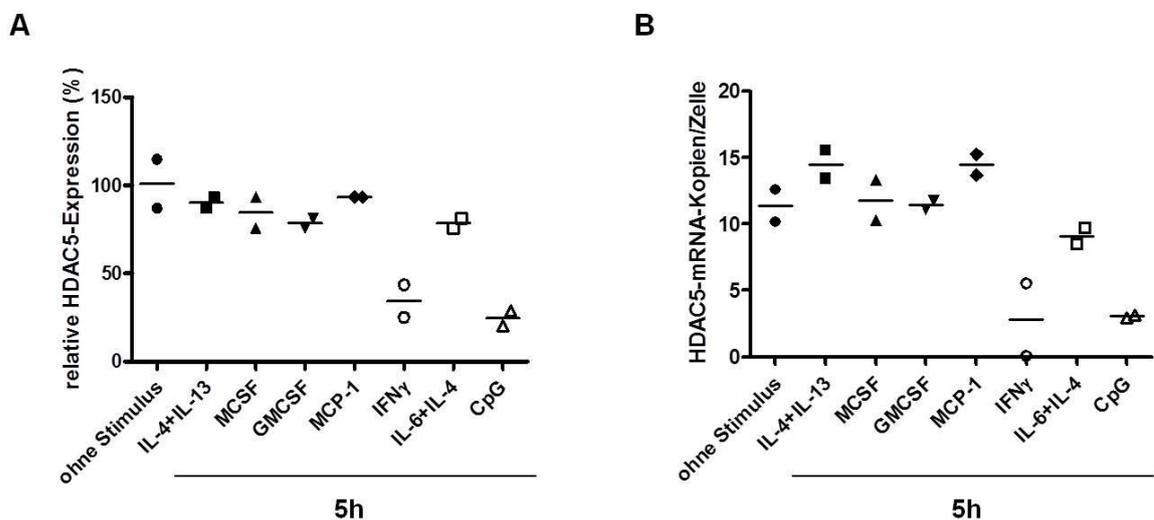
Zur Detektion weiterer pro-inflammatorischer sowie polarisierender oder anti-inflammatorischer Stimuli, die die Expression der HDAC5 in Makrophagen beeinflussen, wurden RAW 264.7-Zellen fünf Stunden mit einer Kombination von IL-4 und IL-13, M-CSF, GM-CSF, MCP-1, IFN $\gamma$ , einer Kombination von IL-4 und IL-6 oder CpG-Oligonukleotiden als TLR9-Agonisten inkubiert (Abb. 6).

Die Zellkulturen in Gegenwart von IFN $\gamma$  und CpG zeigten eine stark verminderte HDAC5-Expression im Vergleich zu den Kontrollen. Die Tendenz zu einer verminderten HDAC5-Expression wurde ebenfalls für die Kombination von IL-4 und

IL-6 gezeigt. Alle anderen Faktoren induzierten keine Veränderung der HDAC5-Expression.

Mit der fehlenden Wirkung der Zytokine IL-4 und IL-13 sowie von M-CSF auf die Expression der HDAC5 war eine Beteiligung der HDAC5 an der Polarisierung von Monozyten zum M2-Phänotyp unwahrscheinlich. Die unveränderte Expression der HDAC5 in Gegenwart von IL-6 und IL-4 unterstützte diese Vermutung. Ebenso wies die unveränderte Expression nach Inkubation mit MCP-1 auf keinen Zusammenhang zwischen der Expression der HDAC5 und der Differenzierung von Monozyten zu dendritischen Zellen bzw. der Aktivierung chemotaktischer Signalwege hin.

Im Gegensatz dazu deutete die Verminderung der Expression der HDAC5 durch das pro-inflammatorische Zytokin IFN $\gamma$  um ca. 70% sowie durch den TLR9-Agonisten CpG um ca. 80% in Kongruenz mit den zuvor erhobenen Daten für LPS auf eine Regulation der Expression der HDAC5 durch pro-inflammatorische Signalwege in Makrophagen hin. Eine Inkubation mit GM-CSF hatte keinen Einfluss auf die Expression der HDAC5. Da die HDAC5-Expression nach Stimulation mit LPS (vgl. auch Abb. 3A/B) und IFN $\gamma$  (Abb. 6) vermindert war, wurde ein Zusammenhang zwischen der Expression der HDAC5 und der Differenzierung von Monozyten zu einem pro-inflammatorischen Phänotyp vermutet.



**Abb. 6: HDAC5-Expressionskinetik in RAW 264.7-Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Faktoren für 5 h.** RAW 264.7-Zellen ( $1 \times 10^6$ ) wurden 5 h mit einer Kombination von IL-4 und IL-13, mit M-CSF, GM-CSF, MCP-1, IFN $\gamma$ , mit einer Kombination von IL-4 und IL-6 bzw. mit CpG-Oligonukleotid stimuliert. Abgesehen vom CpG-Oligonukleotid (500 nM) wurden alle Faktoren in einer Konzentration von

20 ng/ml eingesetzt. Aus den Zelllysaten wurde die RNA isoliert, revers transkribiert und die entstandene cDNA mittels HDAC5-spezifischer Primer quantifiziert. (A) HDAC5-Expression relativ zu GAPDH. (B) Absolute Kopienzahl an HDAC5-mRNA pro Zelle. Mittelwerte und Einzelwerte eines Experiments in Duplikaten

### 4.3 Funktionalität der HDAC5 in RAW 264.7-Zellen als Modell muriner Makrophagen

#### 4.3.1 Etablierung von Transfektionsbedingungen zur Plasmid-vermittelten transienten Überexpression der HDAC5

Um die funktionelle Bedeutung der HDAC5 für die inflammatorische Antwort von Makrophagen zu untersuchen, wurde zunächst eine Überexpression der HDAC5 in Makrophagen mittels Transfektion etabliert.

Zur Identifizierung optimaler Bedingungen für die Transfektion von RAW 264-Zellen wurden die Zellen unter Variation der Spannung und Dauer des ersten und zweiten Pulses (Tab. 2) mit dem Plasmid pHDAC5-YFP transfiziert, das für die humane HDAC5 mit einem YFP-*tag* kodierte.

**Tab. 2: Variation der elektrischen Bedingungen für die Transfektion von RAW 264.7-Zellen mit Plasmid-DNA.** RAW 264.7-Zellen ( $1 \times 10^6$ ) wurden durch Kombinationen von zwei Pulsen mit jeweils unterschiedlicher Spannung und Dauer mit einem Plasmid, das für humane HDAC5 mit einem YFP-*Tag* kodierte, transfiziert.

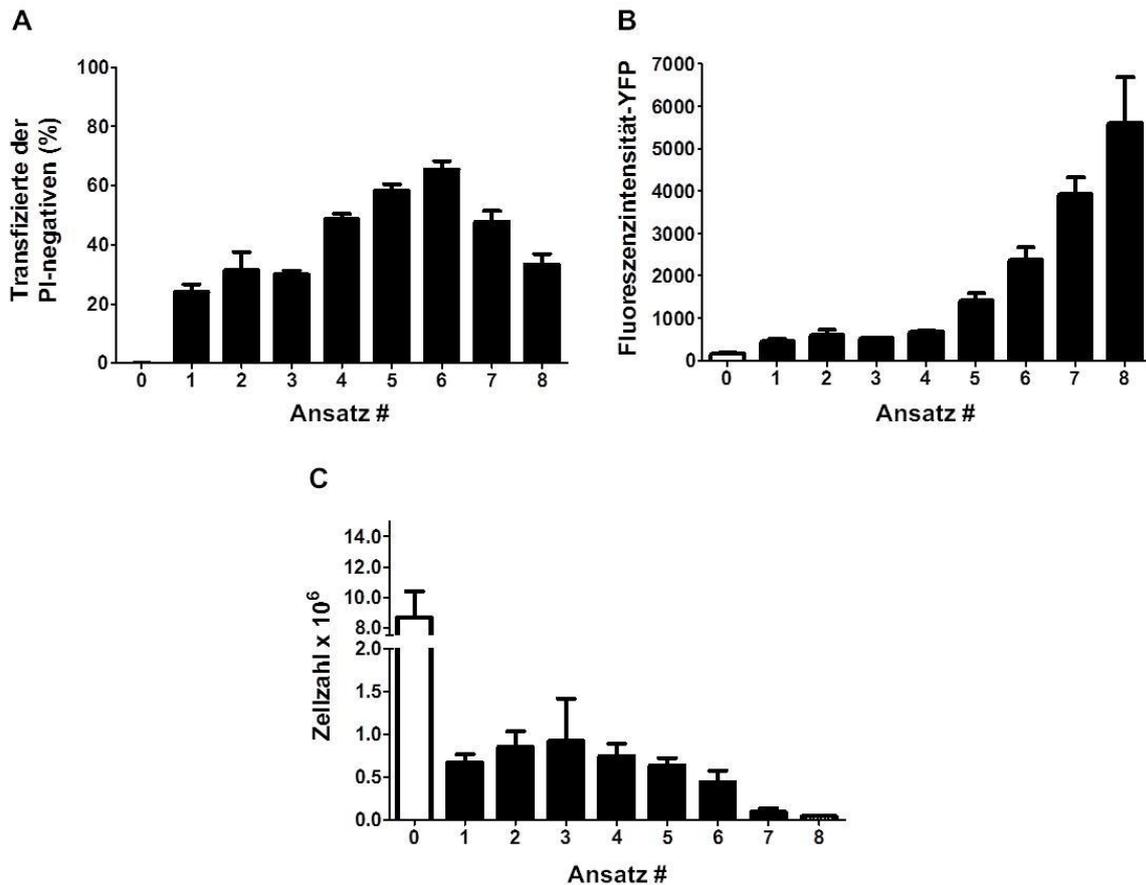
Puls		Ansatz #								
		0	1	2	3	4	5	6	7	8
1.	Spannung (V)		400	400	400	600	600	600	600	600
	Zeit ( $\mu$ s)		400	100	100	400	100	100	100	100
2.	Spannung (V)			100	150		100	150	200	250
	Zeit (ms)			10	10		10	10	10	10

Die Plasmid-vermittelte Fluoreszenz ermöglichte eine durchflusszytometrische Analyse der Transfektionseffizienz und eine Übertragung auf die Transfektion von

pHDAC5, eines Plasmids mit annähernd gleicher Größe aber ohne kodierende Sequenzen für ein fluoreszierendes Reporterprotein (Abb. 7).

Als optimale Bedingung erwies sich eine Pulskombination von 600 V über 100  $\mu$ s als erster Strompuls und 100 V über 10 ms als zweiter Strompuls, da dort sowohl der Anteil transfizierter Zellen (Abb. 7A) als auch deren mittlere Fluoreszenzintensität 24 Stunden nach der Transfektion etwa doppelt so hoch wie bei einer Transfektion mit einem einfachen Puls von 400 V über 400 ms war (Abb. 7B). Die Proliferation der Zellen war bei allen Transfektionsansätzen gegenüber den untransfizierten Kontrollen deutlich eingeschränkt auf maximal 10% der Zellzahl ohne Elektroporation, jedoch waren 24 Stunden nach der Transfektion immer noch über 50% der ursprünglich eingesetzten Zellen ( $1 \times 10^6$ ) und damit etwa ähnlich viele Zellen wie bei allen anderen Transfektionsansätzen unter den oben genannten optimalen Bedingungen vital (Abb. 7C).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden 600 V über 100  $\mu$ s als erster Strompuls und 100 V über 10 ms als zweiter Strompuls als Bedingungen für die Transfektion von pHDAC5 zur Überexpression der HDAC5 in RAW 264.7-Zellen mit dem Ziel der Untersuchung der regulatorischen Funktion der HDAC5 in der Immunantwort von Makrophagen festgelegt.



**Abb. 7: Definition optimaler Bedingungen für die Transfektion von RAW 264.7-Zellen zur Überexpression der HDAC5.** Nach der oben beschriebenen Transfektion von RAW 264.7-Zellen ( $1 \times 10^6$ ) wurden 24 Stunden später (A) der Anteil transfizierter Zellen unter den PI-negativen und (B) die mittlere Fluoreszenzintensität der Plasmid-vermittelten YFP-Produktion durchflusszytometrisch untersucht sowie (C) die Zahl vitaler Zellen bestimmt. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus 1-3 unabhängigen Experimenten mit  $n=3-7$ . Die Transfektionsbedingungen der Ansätze sind in Tabelle 2 wiedergegeben.

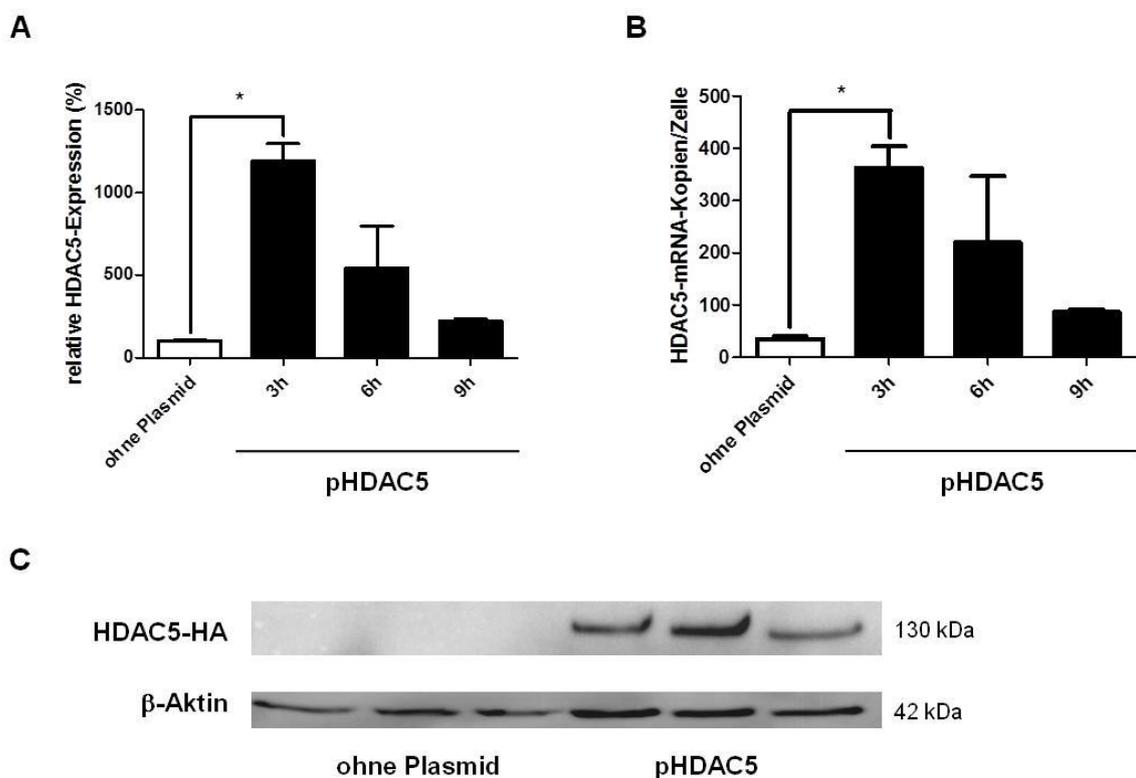
#### 4.3.2 Kinetik der transienten Überexpression der HDAC5

Für die Untersuchung funktioneller Effekte der HDAC5 in Makrophagen wurde eine Überexpression der HDAC5 in RAW 264.7-Zellen durch Transfektion mit pHDAC5, das für murines HDAC5 mit einem HA-tag kodierte, unter den zuvor ermittelten optimalen Elektroporationsbedingungen etabliert. Der Nachweis der Überexpression erfolgte auf mRNA- und Protein-Ebene.

Relativ zu GAPDH war bereits drei Stunden nach der Transfektion die mRNA-Expression der HDAC5 im Vergleich zu den Kontrollen ca. 10fach gesteigert (Abb. 8A). Auch die absolute mRNA-Kopienzahl war drei Stunden nach der Transfektion auf ca. das 7fache der Ausgangsexpression erhöht. Sechs Stunden nach der Transfektion betrug die Steigerung der HDAC5-Expression weiterhin etwa das 4fache der Basisexpression und neun Stunden nach der Transfektion war immer noch eine ungefähr verdoppelte Expression der HDAC5 nachweisbar (Abb. 8B). Nach 24 Stunden kehrte die Expression der HDAC5 wieder zum Basisniveau zurück (Daten nicht gezeigt).

Auf Protein-Ebene war eine der rekombinanten HDAC5 entsprechende Bande (ca.130 kDa) 24 Stunden nach der Transfektion mit einem HA-spezifischen Antikörper deutlich detektierbar (Abb. 8C).

Durch den Nachweis einer transienten Überexpression der HDAC5 war ein Zeitraum um 24 Stunden nach der Transfektion von RAW 264.7-Zellen mit pHDAC5 als Beginn von Untersuchungen zum funktionellen Einfluss der HDAC5 in diesen Zellen geeignet.



**Abb. 8: Nachweis der Überexpression der HDAC5 in RAW 264.7-Zellen auf mRNA- und Proteinebene.** RAW 264.7-Zellen ( $1 \times 10^6$ ) wurden mit pHDAC5 transfiziert. (A,B) Für den Nachweis auf mRNA-Ebene wurden die Zellen drei, sechs

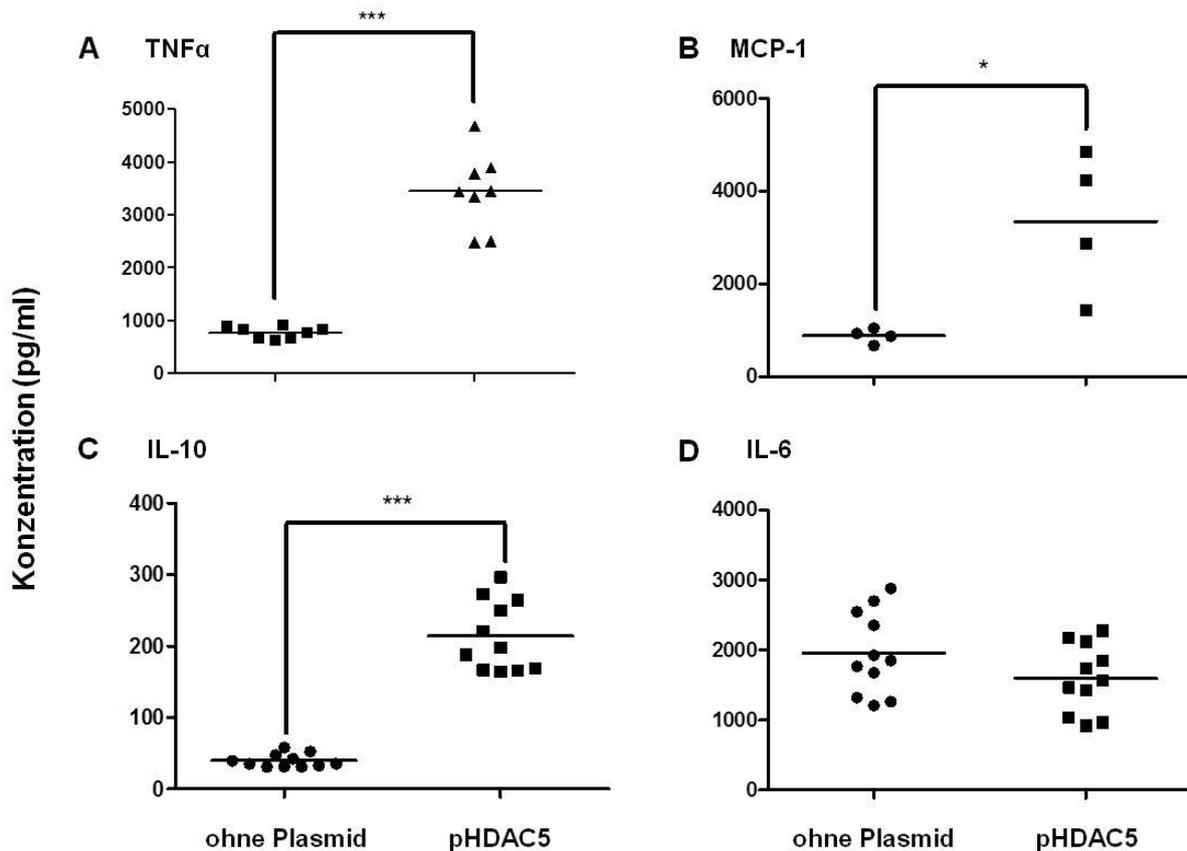
bzw. neun Stunden nach der Transfektion lysiert, die mRNA revers transkribiert und mithilfe HDAC5-spezifischer Primer quantifiziert. (A) HDAC 5-Expression relativ zu GAPDH. (B) Absolute Kopienzahl an HDAC 5-mRNA pro Zelle. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung des Mittelwerts aus einem Experiment mit  $n=3$ . (C) Das HDAC5-Fusionsprotein wurde 24 Stunden nach der Transfektion über den HA-tag durch einen HA-spezifischen Antikörper nachgewiesen.  $\beta$ -Aktin wurde ebenfalls mit einem spezifischen Antikörper sichtbar gemacht. Das Bild zeigt drei unabhängige Ansätze aus einem Experiment.

#### **4.3.3 Einfluss der transienten Überexpression der HDAC5 auf die Sekretion pro- und anti-inflammatorischer Faktoren**

Die Überexpression der HDAC5 ermöglichte eine Untersuchung der regulatorischen Funktion der HDAC5 in der inflammatorischen Reaktion von Makrophagen durch Analyse pro- sowie anti-inflammatorischer Proteine in Überständen von RAW 264.7-Zellen nach Inkubation mit LPS.

Im Vergleich zu Zellen, die ohne Plasmid elektroporiert wurden, war die Sekretion von TNF $\alpha$  durch HDAC5-überexprimierende Zellen auf über 3000 pg/ml etwa vervierfacht (Abb. 9A), von MCP-1 verdreifacht (Abb. 9B) und von IL-10 ebenfalls vierfach erhöht (Abb. 9C). Die Sekretion von IL-6 wurde durch die Überexpression der HDAC5 nicht verändert (Abb. 9d).

Die vermehrte Produktion der Faktoren TNF $\alpha$  und MCP-1 deutete auf einen pro-inflammatorischen Einfluss der HDAC5 auf die Immunantwort von Makrophagen hin. Gleichzeitig verwies die erhöhte Sekretion von IL-10 jedoch auch auf einen möglichen anti-inflammatorischen Effekt der HDAC5, der eine überschießende Immunantwort inhibiert. Der fehlende Effekt der HDAC5 auf die Sekretion von IL-6 verdeutlichte, dass die Überexpression der HDAC5 keine globale Ausschüttung von inflammatorischen Faktoren bewirkte, sondern ausgewählte Signalwege aktivierte.



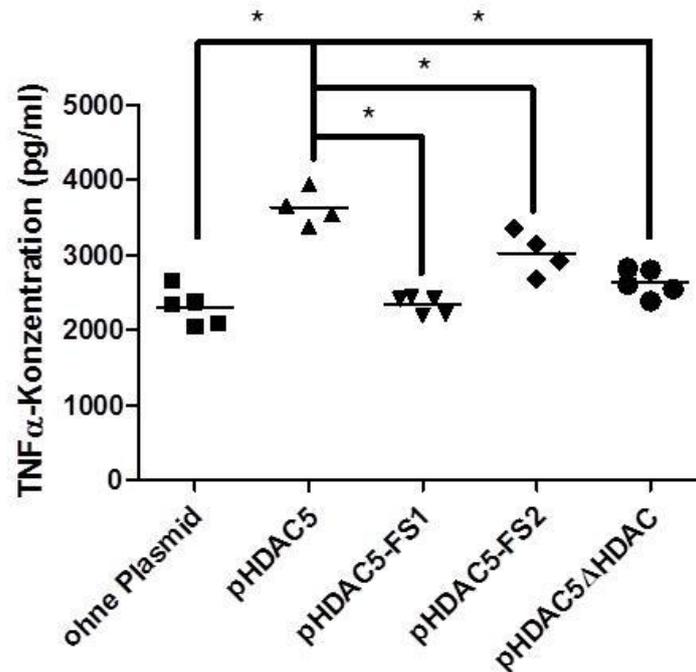
**Abb. 9: Sekretion inflammatorischer Zytokine nach HDAC5-Überexpression in Makrophagen.** RAW 264.7-Zellen ( $5 \times 10^5$ ) wurden 30 h nach Elektroporation mit und ohne pHDAC5 für 16 h mit  $1 \mu\text{g/ml}$  LPS stimuliert und danach in den Zellüberständen die Konzentration von (A)  $\text{TNF}\alpha$ , (C) IL-10, und (D) IL-6 mittels ELISA sowie (B) MCP-1 mittels CBA bestimmt. Mittelwerte und Einzelwerte aus 3-4 unabhängigen Experimenten mit  $n=1-3$  (\* entspricht  $p < 0,05$ ; \*\*\* entspricht  $p < 0,001$ )

Zum Ausschluss einer Verunreinigung der Plasmidpräparationen mit LPS und zum Nachweis der Abhängigkeit der Zytokinveränderungen von der Überexpression eines intakten HDAC5-Proteins, wurden drei Varianten verschiedener Mutationen in pHDAC5 eingeführt. Die erste Variante ergab durch Deletion des Adenosinrestes im Startcodon der HDAC5 eine *Frameshift*-Mutation um eine Base (pHDAC5-FS1); die zweite durch Deletion des Adenosinrestes und Thyminrestes im Startcodon der HDAC5 eine *Frameshift*-Mutation um zwei Basen (pHDAC5-FS2). Beide *Frameshift*-Mutationen sollten eine korrekte Translation der HDAC5-Sequenz und somit die Bildung eines HDAC5-Proteins aus dem Vektor verhindern. Bei der dritten Mutation wurde der 885. Aminosäurerest des HDAC5-Moleküls Histidin durch Phenylalanin

ersetzt, um dadurch selektiv die funktionelle Domäne des HDAC5-Proteins zu inaktivieren (pHDAC5 $\Delta$ HDAC). Alle Mutationen der murinen HDAC5-Sequenz in den Plasmiden wurden durch Sequenzierung bestätigt.

Die Transfektion mit pHDAC5-FS1 führte nach LPS-Stimulation zu einer Konzentration von TNF $\alpha$  im Zellüberstand, die ca. 40% geringer als nach der Transfektion mit dem Ursprungsplasmid war und damit der Konzentration nach einer Elektroporation ohne Plasmid entsprach (Abb. 10). Wurden die RAW 264.7-Zellen mit pHDAC5-FS2 transfiziert, war die TNF $\alpha$ -Konzentration im Vergleich zu Zellen, die mit dem Ausgangsplasmid transfiziert wurden, ebenfalls signifikant um ca. 20% verringert. Auch die Transfektion mit pHDAC5 $\Delta$ HDAC bewirkte eine Reduktion der TNF $\alpha$ -Sekretion um ca. 30%. Wurden die Zellen nach der Transfektion ohne LPS inkubiert, war kein TNF $\alpha$  im Zellüberstand nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

Die signifikante Verminderung der TNF $\alpha$ -Sekretion durch die *Frameshift*-Mutationen der HDAC5 annähernd auf das Basisniveau schloss eine Verunreinigung der Plasmidpräparationen als Ursache der vermehrten Sekretion pro-inflammatorischer Faktoren durch die Transfektion mit pHDAC5 aus. Durch die ebenfalls gegenüber dem Ursprungsplasmid deutlich verminderte TNF $\alpha$ -Konzentration im Zellkulturüberstand nach Transfektion mit pHDAC5 $\Delta$ HDAC konnte darüber hinaus angenommen werden, dass der pro-inflammatorische Effekt der HDAC5 in der Immunantwort von Makrophagen von einer intakten HDAC-Domäne abhängig ist.



**Abb. 10: TNF $\alpha$ -Sekretion von Makrophagen nach Transfektion mit verschiedenen inaktivierenden Mutationen der HDAC5 im Plasmid pHDAC5.** RAW 264.7-Zellen ( $1 \times 10^6$ ) wurden mit pHDAC5, pHDAC5-FS1, pHDAC5-FS2 oder pHDAC5 $\Delta$ HDAC transfiziert. Nach 16 h Kultur in Gegenwart von LPS wurde die TNF $\alpha$ -Konzentration im Zellüberstand mittels ELISA bestimmt. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus einem Experiment mit n=4-5 (\* entspricht p<0,05)

#### 4.3.4 Regulation der Aktivierung des NF $\kappa$ B-Signalwegs durch transiente Überexpression der HDAC5

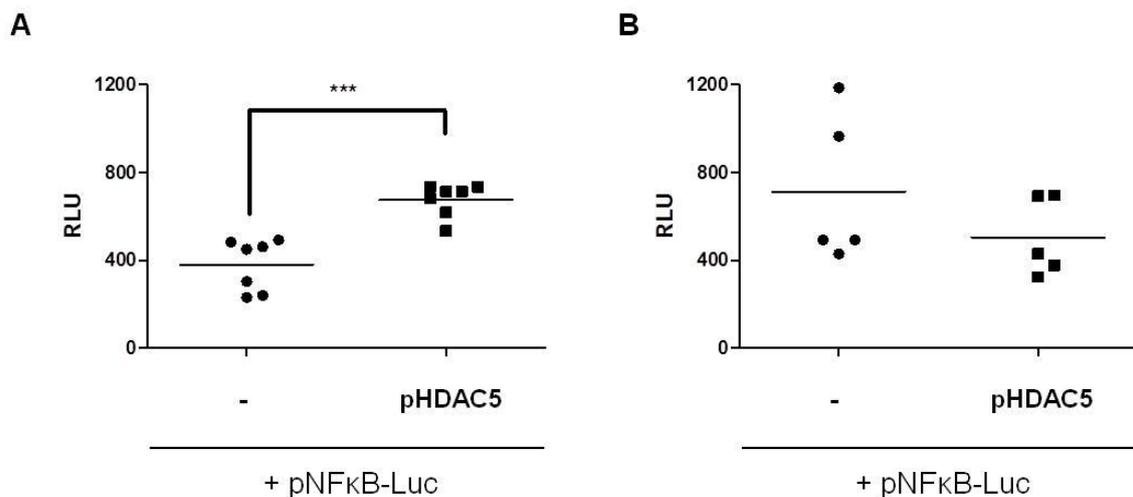
Da die Überexpression der HDAC5 in RAW 264.7-Zellen eine vermehrte Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine induzierte und der NF $\kappa$ B-Signalweg als wichtiger Regulationsmechanismus der inflammatorischen Immunantwort von Makrophagen bekannt ist [174], wurde eine mögliche Beeinflussung der Aktivität von NF $\kappa$ B durch HDAC5 in RAW 264.7-Zellen untersucht.

RAW 264.7-Zellen wurden mit pHDAC5 und pNF $\kappa$ B-Luc, einem NF $\kappa$ B-Reporter-Plasmid, ko-transfiziert. Nach Kultur in Gegenwart von LPS für eine bzw. 16 Stunden wurde das Ausmaß der Aktivierung von NF $\kappa$ B über die Luziferaseaktivität bestimmt.

Nach einer Stunde in Gegenwart von LPS zeigte sich eine um ca. 75% signifikant gesteigerte NF $\kappa$ B-Aktivierung in den HDAC5-überexprimierenden Zellen im Vergleich

zu den Kontrollen (Abb. 11A). Nach 16 Stunden Inkubation mit LPS entsprach die NFκB-Aktivierung in den Zellen, die mit dem pHDAC5 ko-transfiziert waren, wiederum dem Niveau in den Kontrollen (Abb. 11B).

Die Aktivierung von NFκB durch die Überexpression der HDAC5 deutete auf eine Beteiligung des NFκB-Signalweges an der pro-inflammatorischen Funktion der HDAC5 in Makrophagen hin. Da bei einer längeren Kultur in Gegenwart von LPS keine vermehrte Aktivierung von NFκB gegenüber den Kontrollen nachweisbar war, schien die vermehrte Expression der HDAC5 nur eine kurzfristige Hochregulation von NFκB zu bewirken.



**Abb. 11: NFκB-Aktivierung nach Überexpression der HDAC5 in RAW 264.7-Zellen.** RAW 264.7-Zellen ( $1 \times 10^6$ ) wurden mit pHDAC5 und pNFκB-Luc kotransfiziert. Ansätze, die nur mit pNFκB-Luc transfiziert waren, dienten als Kontrolle. Nach 30 h wurden die Zellen für (A) 1 h bzw. (B) 16 h mit  $1 \mu\text{g/ml}$  LPS stimuliert und die Biolumineszenz im Luminometer gemessen. Mittelwerte und Einzelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten mit  $n=3-4$ . (\*\*\*) entspricht  $p < 0,001$ )

#### 4.3.5 Etablierung von Transfektionsbedingungen zum siRNA-vermittelten transienten *knock down* der HDAC5-Expression

Um die funktionellen Effekte, die durch die Überexpression der HDAC5 in Makrophagen gezeigt wurden, zu bestätigen, wurde ein HDAC5-*knock down* in RAW 264.7-Zellen etabliert.

Die optimalen Bedingungen zur Transfektion von RAW 264.7-Zellen mit siRNA wurden ermittelt, indem die Zellen unter Variation der Spannung und Dauer des

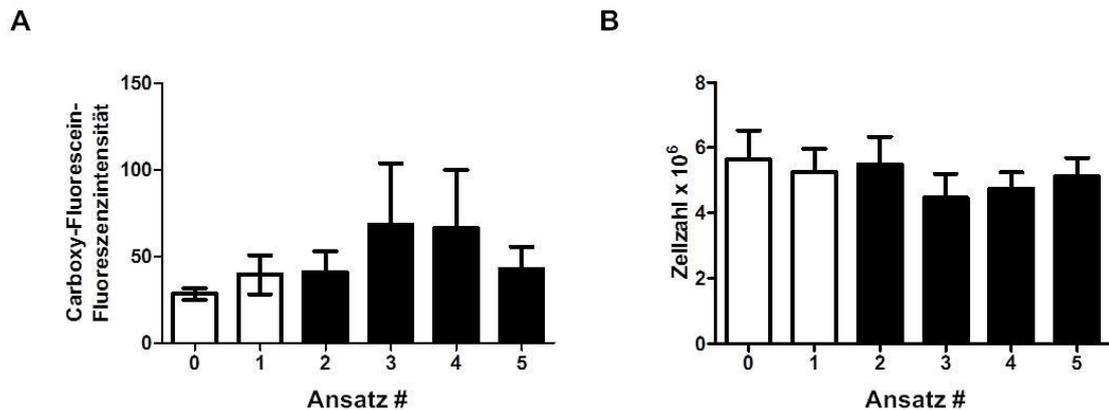
ersten und zweiten Pulses der Elektroporation mit einer grün fluoreszierenden Kontroll-siRNA transfiziert wurden (Tab. 3).

**Tab. 3: Variation der elektrischen Bedingungen für die Transfektion von RAW 246.7-Zellen mit siRNA.** RAW 264.7-Zellen ( $1 \times 10^6$ ) wurden durch Kombinationen von zwei Pulsen mit jeweils unterschiedlicher Spannung und Dauer mit 120 pmol grün fluoreszierender Kontroll-siRNA transfiziert. Ein Kontrollansatz (0) erhielt weder Strompulse noch siRNA.

Puls		Ansatz #				
		1	2	3	4	5
1.	Spannung (V)		400	600	600	
	Zeit ( $\mu$ s)		100	400	100	
2.	Spannung (V)				100	100
	Zeit (ms)				10	10

Wie schon bei der Transfektion mit Plasmiden war die Kombination eines ersten Pulses von 600 V über 100  $\mu$ s mit einem zweiten von 100 V über 10 ms besonders geeignet, da unter diesen Konditionen die mittlere Fluoreszenzintensität gegenüber dem Basisniveau um ca. 70% gesteigert war bei einer lediglich um 10% reduzierten Zellzahl gegenüber den Kontrollen (Abb. 12).

Anhand dieser Daten konnte im Folgenden ein transienter *knock down* der HDAC5 in RAW 264.7-Zellen für funktionelle Analysen der regulatorischen Funktion der HDAC5 in Makrophagen etabliert werden.



**Abb. 12: Definition optimaler Elektroporationsbedingungen für den *knock down* der HDAC5 in RAW 264.7-Zellen.** RAW 264.7-Zellen ( $1 \times 10^6$ ) wurden unter Variation der Spannung und Dauer des ersten und zweiten Pulses der Elektroporation mit einer grün fluoreszierenden Kontroll-siRNA transfiziert. Nach 24 h wurde (A) die Transfektionseffizienz durchflusszytometrisch anhand der mittleren Carboxy-Fluorescein-Fluoreszenzintensität der Zellen sowie (B) die Zellzahl ermittelt. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus zwei unabhängigen Experimenten mit Duplikaten bzw. Triplikaten. Die Transfektionsbedingungen der Ansätze sind in Tabelle 3 wiedergegeben.

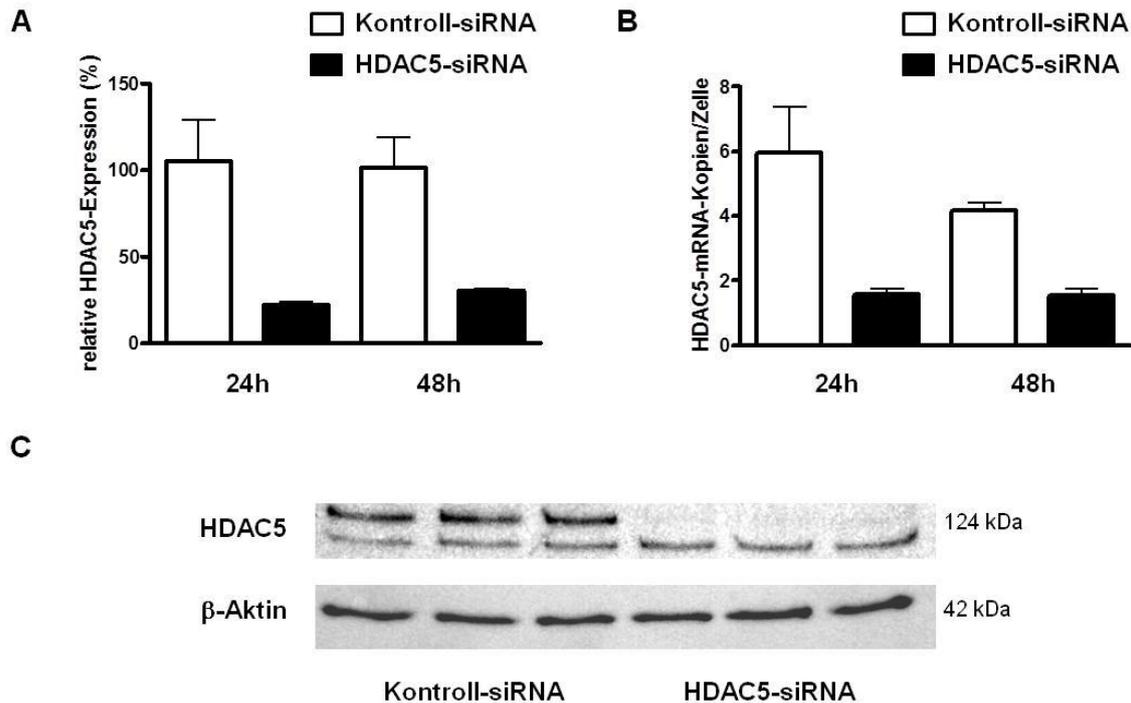
#### 4.3.6 Kinetik des transienten *knock down* der HDAC5

Unter den optimalen Bedingungen für die Transfektion von RAW 264.7-Zellen mit siRNA wurde ein *knock down* der HDAC5 in diesen Zellen durchgeführt und die Auswirkungen der verminderten Expression der HDAC5 auf das inflammatorische Potential von Makrophagen charakterisiert.

Der Erfolg des *knock down* wurde auf mRNA- und Proteinebene kontrolliert (Abb. 13). Die relative mRNA-Expression der HDAC5 war 24 Stunden nach der Transfektion im Vergleich zu den Kontrollen um ca. 80% reduziert. Nach 48 Stunden war immer noch eine Reduktion um ca. 70% nachweisbar (Abb. 13A). Die Inhibition der Expression der HDAC5 wurde auch in der absoluten mRNA-Kopienzahl pro Zelle durch eine Verminderung auf unter 30% nach 24 Stunden und unter 50% der Basisexpression nach 48 Stunden bestätigt (Abb. 13B). Übereinstimmend konnte auf Proteinebene eine deutliche Abnahme der Proteinmenge durch Fehlen der HDAC5-Bande bei ca. 124 kDa im Vergleich zu den Kontrollen nach 24 Stunden gezeigt

werden (Abb. 13C). Auch 48 Stunden nach der Transfektion war in den *knock down*-Ansätzen nur eine sehr schwache HDAC5-Bande im Vergleich zu den Kontrollen nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

Der Nachweis eines transienten *knock down* der HDAC5 über 48 Stunden ermöglichte die weiterführende Untersuchung des Einflusses einer fehlenden HDAC5-Expression auf die Immunantwort von Makrophagen innerhalb dieses Zeitraums.



**Abb. 13: Nachweis des HDAC5-*knock down* in RAW 264.7-Zellen auf mRNA- und Proteinebene.** RAW 264.7-Zellen ( $1 \times 10^6$ ) wurden mit einem Gemisch aus zwei spezifischen HDAC5-siRNAs bzw. einer Kontroll-siRNA transfiziert. (A,B) Nach 24 bzw. 48 Stunden wurde die HDAC5-mRNA mithilfe HDAC5-spezifischer Primer (A) relativ zu GAPDH und (B) als absolute Kopienzahl quantifiziert. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus einem Experiment mit Triplikaten. (C) Auf Proteinebene wurde 24 Stunden nach Transfektion die HDAC5 mit einem spezifischen HDAC5-Antikörper detektiert. Als Ladungskontrolle wurde  $\beta$ -Aktin sichtbar gemacht. Das Bild repräsentiert drei unabhängige Ansätze aus einem Experiment.

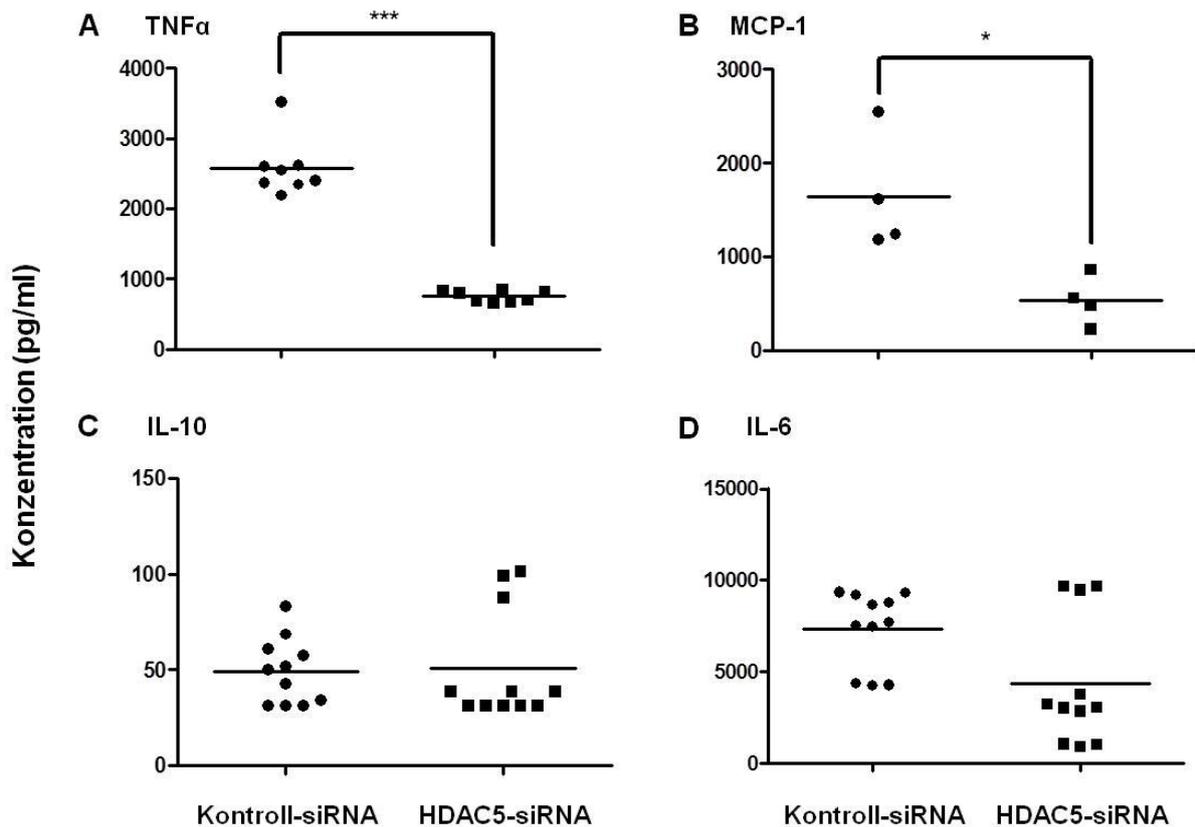
#### 4.3.7 Einfluss des transienten *knock down* der HDAC5 auf die Sekretion pro- und anti-inflammatorischer Faktoren

Um die funktionellen Ergebnisse der Überexpression der HDAC5 in Makrophagen zu bestätigen und eine unspezifische Aktivierung der Makrophagenzelllinie durch die Transfektion selbst auszuschließen, wurde die Sekretion pro- und anti-inflammatorischer Faktoren von RAW 264.7-Zellen nach *knock down* der HDAC5 untersucht.

Die Konzentration von TNF $\alpha$  war gegenüber den Kontrollen durch den HDAC5-*knock down* von ca. 2500 pg/ml auf unter 900 pg/ml signifikant reduziert (Abb. 14A). Ebenso wurde die Konzentration von MCP-1 durch den *knock down* der HDAC5 gegenüber den Kontrollen mehr als halbiert (Abb. 14B). Die Sekretion von IL-10 (Abb. 14C) und IL-6 (Abb. 14D) war im Vergleich zu den Kontrollen hingegen nicht verändert.

In Übereinstimmung mit den Daten aus der Überexpression der HDAC5 führte eine verminderte Expression der HDAC5 zu einer Reduktion der Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine. Die Sekretion von IL-6 wurde durch den *knock down* wie bereits durch die Überexpression der HDAC5 nicht verändert und bestätigte somit, dass eine Modulation der Expression der HDAC5 nicht zu einer globalen Aktivierung bzw. Inhibition der Zytokinsekretion führt.

Im Gegensatz zur Überexpression der HDAC5 bewirkte die verminderte Expression keine Veränderung der IL-10-Sekretion. Zusammenfassend deutet die funktionelle Analyse der veränderten HDAC5-Expression auf eine pro-inflammatorische Funktion der HDAC5 in Makrophagen hin.



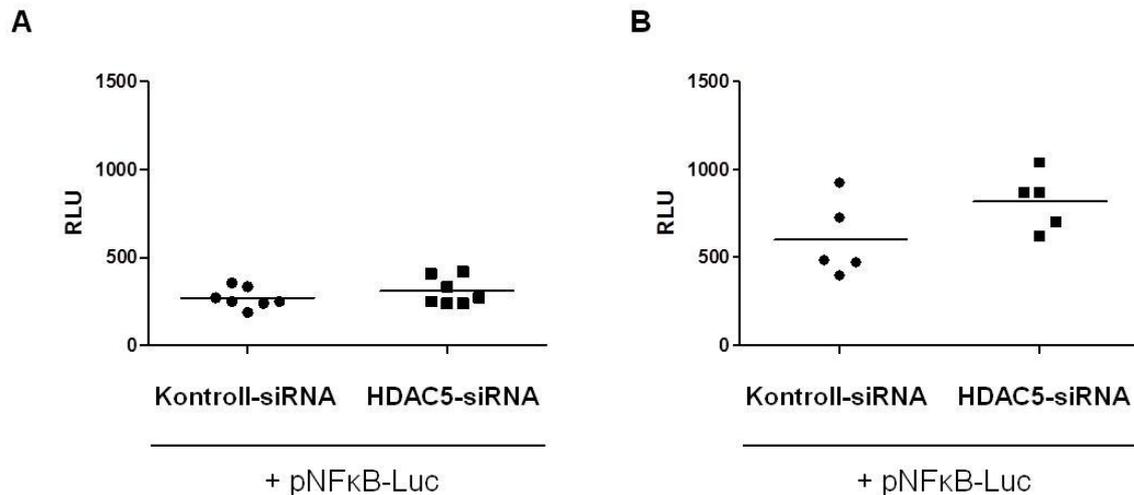
**Abb. 14: Sekretion inflammatorischer Zytokine nach *knock down* der HDAC5 in Makrophagen.** RAW 264.7-Zellen ( $1 \times 10^6$ ) wurden mit Kontroll-siRNA bzw. HDAC5-spezifischer siRNA transfiziert und 30 h nach der Transfektion für 16 h mit 1  $\mu$ g/ml LPS inkubiert. In den Zellüberständen wurde die Konzentration von (A) TNF $\alpha$ , (C) IL-10 und (D) IL-6 mittels ELISA sowie von (B) MCP-1 mittels CBA ermittelt. Mittelwerte und Einzelwerte aus 3 bzw. 4 unabhängigen Experimenten mit  $n=1-3$  (\* entspricht  $p < 0,05$ ; \*\*\* entspricht  $p < 0,001$ )

#### 4.3.8 Aktivierung des NF $\kappa$ B-Signalwegs durch transienten *knock down* der HDAC5

Aufgrund des steigernden Effekts der HDAC5-Überexpression auf die Aktivierung von NF $\kappa$ B wurde untersucht, ob auch die Abwesenheit funktioneller HDAC5 die Aktivierung von NF $\kappa$ B in RAW 264.7-Zellen nach Inkubation mit LPS beeinflusst.

Die Aktivierung des NF $\kappa$ B-Signalweges wurde durch die verminderte Expression der HDAC5 im Vergleich zu den Kontrollen weder nach Inkubation mit LPS über eine noch über 16 Stunden verändert (Abb. 15).

Im Gegensatz zur Überexpression der HDAC5 entsprach die NFκB-Aktivierung bei eingeschränkter HDAC5-Expression dem Basisniveau durch LPS-Stimulation. Ein direkter Zusammenhang zwischen der NFκB-Aktivität und einer verminderten HDAC5-Expression konnte somit nicht festgestellt werden.



**Abb. 15: NFκB-Aktivierung nach *knock down* der HDAC5 in Makrophagen.**

RAW 264.7-Zellen ( $1 \times 10^6$ ) wurden mit HDAC5-spezifischer siRNA bzw. Kontroll-siRNA und einem NFκB-Reporter-Plasmid kotransfiziert und 30 h nach der Transfektion für A) 1 h bzw. B) 16 h mit LPS inkubiert, bevor die Aktivität von NFκB mittels Biolumineszenz ermittelt wurde. Mittelwerte und Einzelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten mit  $n=2-4$

#### 4.3.9 Einfluss von simultaner HDAC5-Überexpression und -*knock down* auf die Sekretion pro-inflammatorischer Faktoren

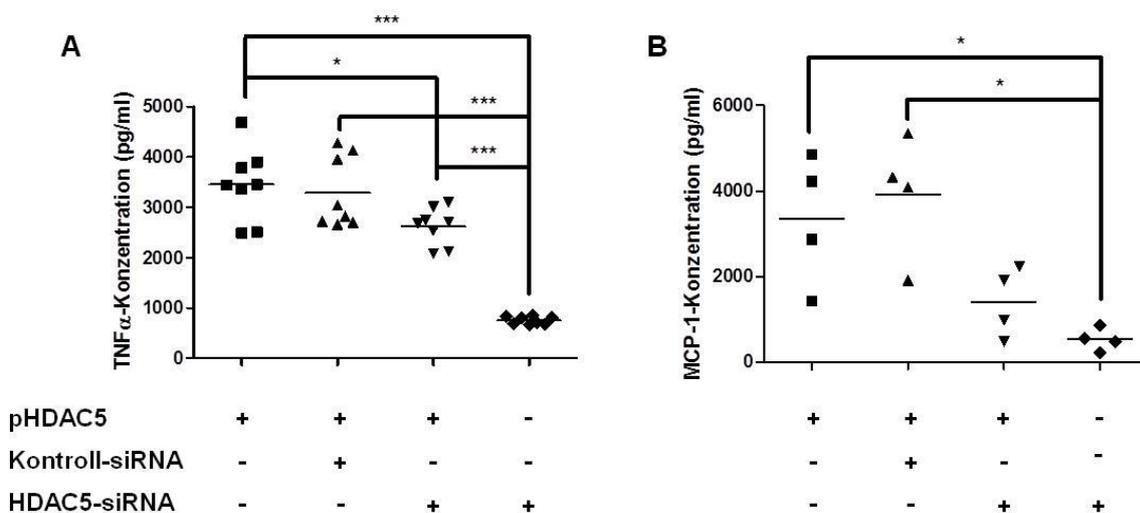
Die Abhängigkeit der Sekretion pro- und anti-inflammatorischer Zytokine durch Makrophagen von der HDAC5-Expression sollte durch Kombination der Überexpression mit dem *knock down* der HDAC5 bekräftigt werden.

Die Transfektion von RAW 264.7-Zellen mit pHDAC5 allein resultierte in einer hohen TNFα-Konzentration (Abb. 16A; vgl. auch Abb. 9A). Eine Kotransfektion mit Kontroll-siRNA hatte keinen weiteren Effekt auf die Sekretion von TNFα, wohingegen die Kotransfektion mit HDAC5-spezifischer siRNA die steigernde Wirkung der Plasmid-vermittelten HDAC5-Überexpression auf die Produktion von TNFα um ca. 30% verminderte. Die Transfektion mit der HDAC5-spezifischen siRNA verdeutlichte, dass die Aufhebung des steigernden Effektes der Überexpression durch die Kotransfektion mit der HDAC5-siRNA nur partiell war, da die Transfektion mit der

HDAC5-siRNA allein zu einer Verminderung der TNF $\alpha$ -Konzentration von über 75% gegenüber der nach Überexpression der HDAC5 führte (Abb. 16A).

Der gleiche Zusammenhang wurde auch für die Sekretion von MCP-1 gezeigt: Wiederum bewirkte die Transfektion mit pHDAC5 eine hohe Chemokinsekretion (vgl. auch Abb. 9B) und die Kotransfektion mit Kontroll-siRNA veränderte diesen Effekt nicht. Die Kotransfektion mit der HDAC5-spezifischen siRNA zeigte hingegen wie schon bei der Untersuchung von TNF $\alpha$  die Tendenz zu einer Reduktion der MCP-1-Konzentration um ca. 50% gegenüber der alleinigen Plasmid-Transfektion. Der Effekt der Plasmid-vermittelten Überexpression der HDAC5 wurde durch die Kotransfektion mit HDAC5-spezifischer siRNA gegenüber der Kontrolle mit einer alleinigen Transfektion der HDAC5-siRNA nur partiell aufgehoben (Abb. 16B).

Die Sekretion der pro-inflammatorischen Faktoren TNF $\alpha$  und MCP-1 durch RAW 264.7-Zellen zeigte eine deutliche Abhängigkeit von der Höhe der HDAC5-Expression und verwies damit auf eine zentrale regulatorische Funktion der HDAC5 in der inflammatorischen Antwort von Makrophagen.



**Abb. 16: Abhängigkeit der Sekretion pro-inflammatorischer Faktoren von der HDAC5-Expression in RAW 264.7-Zellen.** RAW 264.7-Zellen ( $1 \times 10^6$ ) wurden mit pHDAC5 allein transfiziert oder mit pHDAC5 und HDAC5-spezifischer siRNA bzw. Kontroll-siRNA kotransfiziert. Die Transfektion mit HDAC5-spezifischer siRNA diente als Kontrolle. Nach 30 h wurden die Zellen 16 h mit LPS stimuliert und in den Zellüberständen die Konzentration von (A) TNF $\alpha$  mittels ELISA bzw. (B) MCP-1

mittels CBA bestimmt. Mittelwerte und Einzelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit n=1-3 (\* entspricht p<0,05; \*\*\* entspricht p<0,001)

#### **4.4 Einfluss der Expressionsmodulation der HDAC5 auf die Expression anderer HDACs**

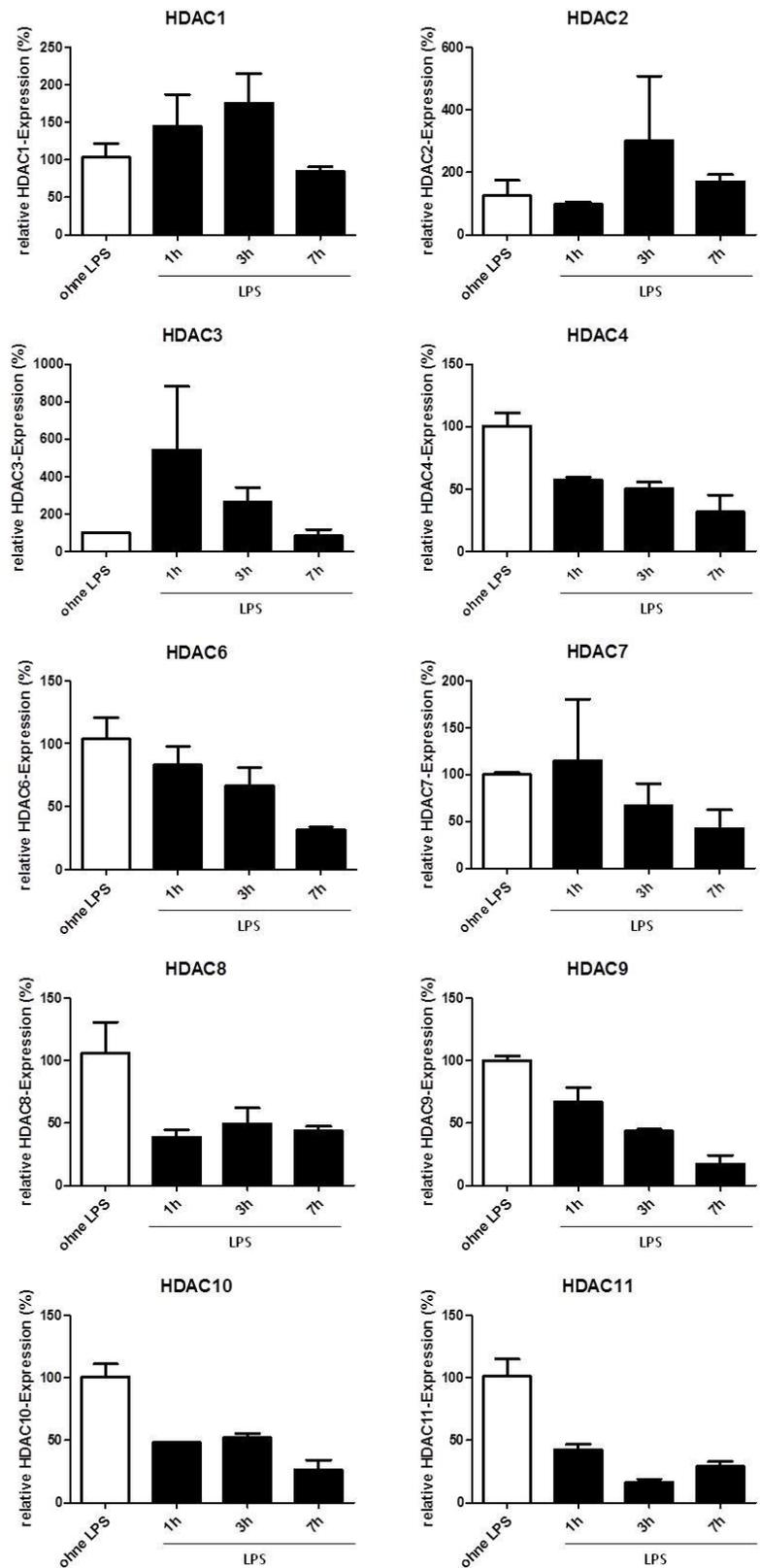
##### **4.4.1 Kinetik der Wirkung von LPS auf die Basisexpression der HDACs**

Aufgrund der veränderten Expression der HDAC5 in RAW 264.7-Zellen durch Kultur in Gegenwart von LPS (vgl. Abb. 3), sollte untersucht werden, ob LPS auch die Expression anderer HDACs beeinflusst.

Die Expression der HDACs 4, 6, 7, 8, 9, 10 und 11 wurde ähnlich wie HDAC5 durch die Stimulation mit LPS vermindert. Dabei zeigten die HDACs 4, 6, 7, 9 und 10 parallel zur HDAC5 eine zeitabhängige Verminderung der Expression mit einer maximalen Abnahme von ca. 70% nach sieben Stunden. Die Expression der HDAC8 wurde bereits nach einer Stunde Kultur in Gegenwart von LPS auf ca. 40% der Basisexpression gesenkt und behielt dieses Expressionsniveau auch nach drei und sieben Stunden bei. Die Verminderung der Expression der HDAC11 erreichte nach drei Stunden ihr Maximum von ca. 80% und zeigte nach sieben Stunden wieder eine leicht ansteigende Tendenz.

Im Gegensatz zu den bisher genannten HDACs wurde die Expression der HDACs 1, 2 und 3 durch die Kultur in Gegenwart von LPS erhöht. So war die Expression der HDAC1 und 2 nach drei Stunden mehr als verdoppelt. Die Expression der HDAC3 wurde bereits nach einer Stunde auf das Fünffache gesteigert. Nach sieben Stunden Inkubation erreichte die Expression der drei genannten HDACs wiederum ungefähr das Ausgangsniveau unstimulierter Kontrollen (Abb. 17).

Zusammenfassend wiesen diese Ergebnisse aufgrund der ähnlichen Modulation der Expression der HDACs einer funktionellen Klasse durch die LPS-Stimulation auf eine mögliche Interaktion oder gemeinsame Funktion der HDACs einer funktionellen Klasse in Makrophagen hin.



**Abb. 17: Expressionsmodulation anderer HDACs durch Inkubation mit LPS.**

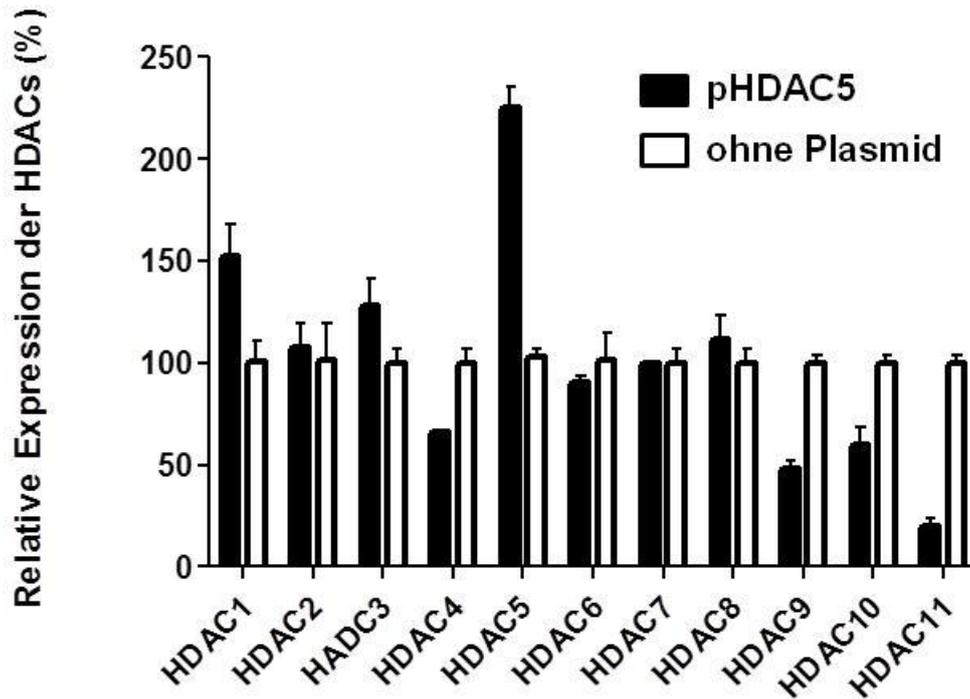
RAW 264.7-Zellen ( $1 \times 10^6$ ) wurden 7 h ohne, bzw. 7 h, 3 h oder 1 h in Gegenwart von LPS kultiviert. Anschließend wurde die RNA der einzelnen HDACs mit den jeweiligen

spezifischen Primern quantifiziert. Mittelwerte und Standardabweichung aus 1-2 unabhängigen Experimenten mit n=2-4

#### **4.4.2 Einfluss der transienten Überexpression der HDAC5**

Um eine mögliche Interaktion der HDAC5 mit anderen HDACs zu untersuchen, wurde der Einfluss der Expressionshöhe der HDAC5 auf andere HDAC-Subtypen charakterisiert, indem in HDAC5-überexprimierenden Zellen die Expression der anderen HDACs quantifiziert wurde.

Die Plasmid-vermittelte Überexpression der HDAC5 wurde durch eine mehr als verdoppelte Expression gegenüber den Kontrollen bestätigt. Die Expression der HDAC1 wurde durch die vermehrte Expression der HDAC5 um 50% gesteigert. Ebenso wurde auch die Expression der HDAC3 um 25% erhöht. Im Gegensatz dazu wurde die Expression der HDAC4 und 10 um ca. 25% reduziert. Die Expression der HDAC9 wurde um 50% und die der HDAC11 um 75% gegenüber den Kontrollen durch die Überexpression der HDAC5 vermindert. Die Expression der anderen HDACs war gegenüber den Kontrollen unverändert (Abb. 18). Diese Ergebnisse unterstützen somit die Vermutung, dass HDAC5 mit anderen HDAC-Subtypen interagiert.



**Abb. 18: Einfluss der transienten Überexpression der HDAC5 auf die Expression anderer HDACs.** RAW 264.7-Zellen ( $1 \times 10^6$ ) wurden 9 h nach der Transfektion mit pHDAC5 lysiert und die mRNA der einzelnen HDACs mittels jeweils spezifischer Primer quantifiziert. Zellen, die ohne Plasmid elektroporiert worden waren, dienten als Kontrolle (100%). Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus einem Experiment mit  $n=2-3$

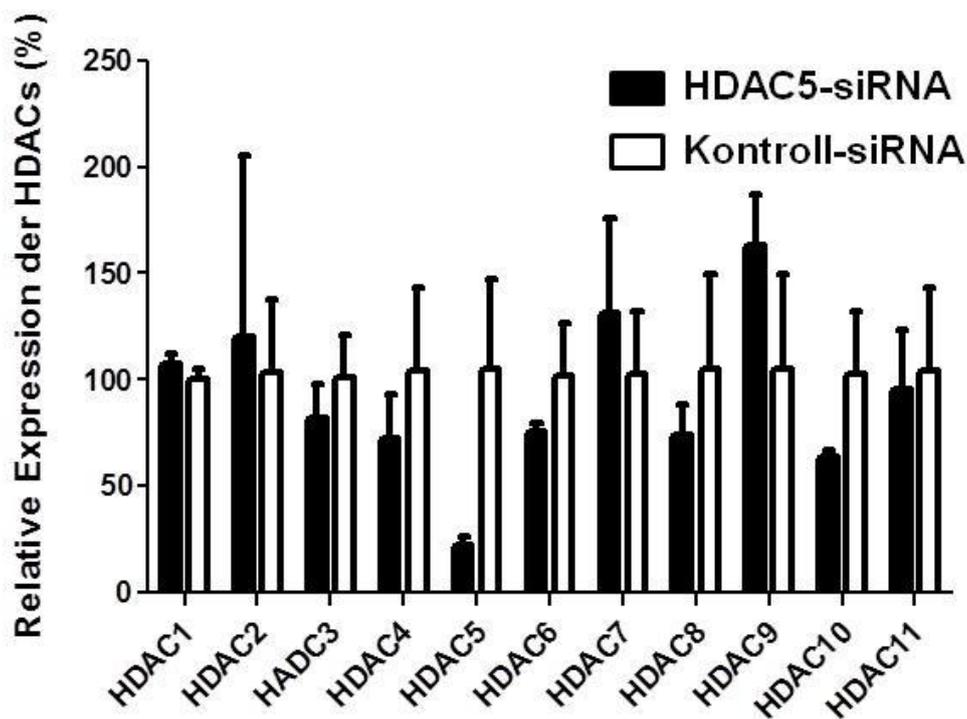
#### 4.4.3 Einfluss des transienten *knock down* der HDAC5

Die für die Überexpression bereits gezeigten Effekte einer Expressionsmodulation der HDAC5 auf die Expression anderer HDACs in Makrophagen sollten durch Expressionsanalysen der einzelnen HDAC-Subtypen in RAW 264.7-Zellen nach selektivem *knock down* der HDAC5 bestätigt werden.

Der Erfolg des selektiven *knock down* der HDAC5 wurde durch eine Abnahme der Expression auf ca. 20% der Basisexpression bestätigt. Die Expression der HDAC3, 4, 6 und 8 war durch die verminderte Expression der HDAC5 um ca. 20% gegenüber den Kontrollen vermindert. Ebenso wurde die Expression der HDAC10 um ca. 30% reduziert. Im Gegensatz dazu war die Expression der HDAC2 um ca. 10%, der HDAC7 um ca. 25% und der HDAC9 um mehr als 50% durch die Inhibition der Transkription der HDAC5 gesteigert. Die Expression der anderen HDAC-Subtypen

wurde durch die Modulation der HDAC5-Expression hingegen nicht verändert (Abb. 19).

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der HDAC5-Überexpression führte der *knock down* der HDAC5 nicht zu gleichgerichteten Veränderungen der HDACs einer funktionellen Klasse, da einzelne HDACs der Klassen I und II vermehrt, andere HDACs derselben Klassen hingegen vermindert exprimiert wurden.



**Abb. 19: Einfluss des *knock down* der HDAC5 auf die Expression anderer HDACs.** RAW 264.7-Zellen ( $1 \times 10^6$ ) wurden mit Kontroll-siRNA (100%) bzw. HDAC5-spezifischer siRNA transfiziert. Nach 24 h wurde die mRNA der einzelnen HDACs mittels spezifischer Primer quantifiziert. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus einem Experiment mit  $n=2-3$

In Zusammenschau der Ergebnisse der Überexpression und des *knock down* der HDAC5 waren insbesondere die Expressionsmodulationen der HDAC3 und 9 durch die Variation der HDAC5-Expression konsistent. So wurde die Expression der HDAC3 gleichgerichtet zu HDAC5 verändert und deutete somit auf eine direkte Abhängigkeit der Expression der HDAC3 von der vorhandenen HDAC5-Proteinmenge in Makrophagen hin. Die Veränderung der Expression der HDAC9 war hingegen der der HDAC5 entgegengesetzt und verwies auf eine Inhibition der

HDAC9 durch HDAC5 oder eine Gegenregulation zur Kontrolle einer überschießenden Aktivierung der HDACs der Klasse II (Tab. 4).

**Tab. 4: Einfluss der Expressionsmodulation der HDAC5 auf die Expression anderer HDACs**

HDAC-Klasse	HDAC#	Veränderung in Gegenwart von	
		HDAC5-Überexpression	HDAC5- <i>knock down</i>
I	1	↑	→
	2	→	↑
	3	↑	↓
	8	→	↓
II	4	↓	↓
	6	→	↓
	7	→	↑
	9	↓	↑
	10	↓	↓
IV	11	↓	→

↑ = erhöht, → = unverändert, ↓ = vermindert

#### 4.5 Funktionalität der HDAC5 in U937-Zellen als Modell für humane monozytäre Zellen

##### 4.5.1 Kinetik des siRNA-vermittelten transienten *knock down* der HDAC5

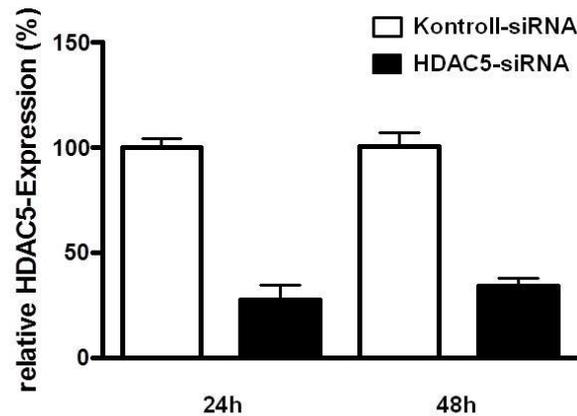
Die Übertragbarkeit der bisherigen Ergebnisse aus murinen Zellen auf humane Zellen wurde mithilfe eines HDAC5-*knock down* in der humanen U937-Zelllinie überprüft.

Die für die Elektroporation von U937-Zellen optimalen Bedingungen waren bereits durch T. Stroh aus der Arbeitsgruppe (persönliche Mitteilung) bekannt. Der Erfolg des *knock down* der HDAC5 wurde auf mRNA- und Proteinebene nachgewiesen.

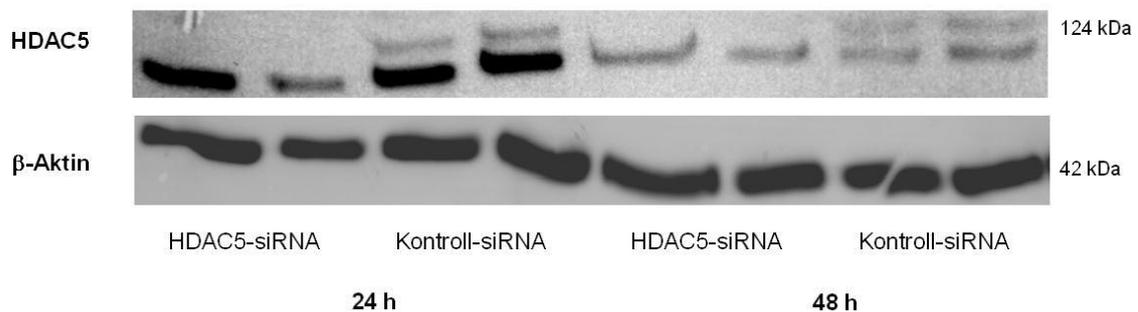
Die mRNA-Quantifizierung zeigte eine deutliche Verminderung der HDAC5-Expression um ca. 80% nach 24 Stunden und über 60% nach 48 Stunden gegenüber Zellen, die mit einer Kontroll-siRNA transfiziert worden waren (Abb. 20A). Auf Proteinebene konnte die stark verminderte HDAC5-Expression ebenfalls belegt

werden, da die HDAC5-Bande bei 124 kDa im Vergleich zu den Kontrollen nach 24 Stunden nicht und nach 48 Stunden nur sehr schwach nachweisbar war (Abb. 20B). Der Nachweis des HDAC5-*knock down* bis zu 48 Stunden ermöglichte Analysen der regulatorischen Funktion der HDAC5 in der Immunantwort von U937-Zellen innerhalb dieses Zeitraums als Modell für humane Makrophagen.

A



B



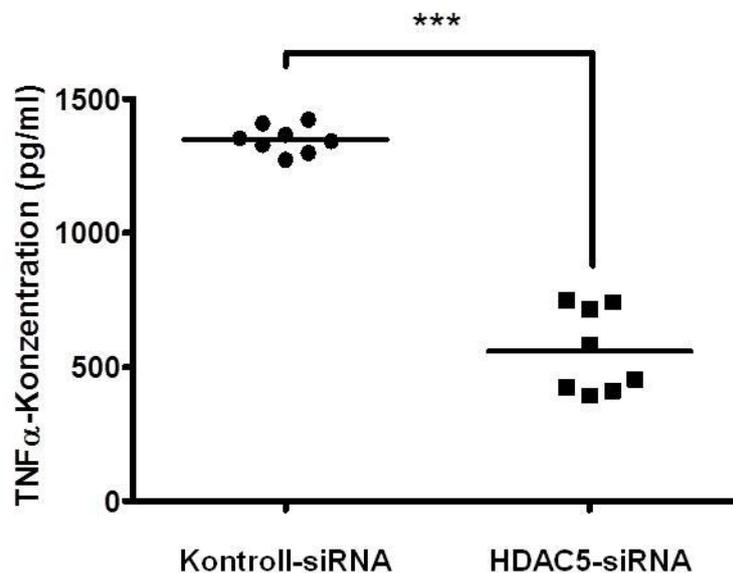
**Abb. 20: HDAC5-*knock down* in U937-Zellen.** U937-Zellen ( $1 \times 10^6$ ) wurden mit HDAC5-spezifischer siRNA bzw. Kontroll-siRNA transfiziert. Nach 24 h bzw. 48 h wurde (A) die HDAC5-mRNA mittels HDAC5-spezifischer Primer quantifiziert. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der Mittelwerte aus einem Experiment mit Duplikaten bzw. Triplikaten. Zu den gleichen Zeitpunkten wurde (B) die HDAC5-Proteinmenge mithilfe eines HDAC5-spezifischen Antikörpers detektiert. Nach vollständiger Entfernung des HDAC5-spezifischen Antikörpers wurde  $\beta$ -Aktin mithilfe eines spezifischen Antikörpers nachgewiesen. Das Bild zeigt jeweils zwei unabhängige Ansätze aus einem Experiment.

#### 4.5.2 Einfluss des transienten *knock down* der HDAC5 auf die Sekretion von TNF $\alpha$

Die Ergebnisse der regulatorischen Analysen in den murinen RAW 264.7-Zellen wiesen auf eine pro-inflammatorische Funktion der HDAC5 in Makrophagen der Maus hin. Um zu prüfen, ob auch in humanen Makrophagen eine derartige Funktion der HDAC5 vorhanden ist, wurde der Effekt des *knock down* der HDAC5 auf die Sekretion von TNF $\alpha$  untersucht.

In Übereinstimmung mit den Daten aus dem murinen Modell wurde die TNF $\alpha$ -Konzentration im Überstand der U937-Zellen durch den HDAC5-*knock down* im Vergleich zu Zellen, die mit einer Kontroll-siRNA transfiziert worden waren, halbiert (Abb. 21).

Aufgrund des vergleichbaren Effekts des *knock down* der HDAC5 in den humanen und murinen Makrophagen konnte eine Übertragbarkeit der funktionellen und regulatorischen Mechanismen aus den Ergebnissen des murinen Modells auf humane Makrophagen angenommen werden.



**Abb. 21: TNF $\alpha$ -Sekretion nach HDAC5-*knock down* in U937-Zellen.** U937-Zellen ( $1 \times 10^6$ ) wurden nach der Transfektion mit HDAC5-spezifischer siRNA bzw. Kontroll-siRNA für 24 h mit 10 ng/ml PMA differenziert und anschließend 16 h mit 10 ng/ml LPS stimuliert. Die Überstände der Zellen wurden mittels ELISA auf ihre TNF $\alpha$ -Konzentration untersucht. Mittelwerte und Einzelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten mit  $n=4$  (\*\*\*) entspricht  $p < 0,001$ )

## 5 Diskussion

### 5.1 Ist die HDAC5 ein Regulator der inflammatorischen Reaktion von Makrophagen?

Intestinale Makrophagen sind mithilfe ihrer TLRs entscheidend an der Erkennung und Abwehr von luminalen Bakterien beteiligt [36]. Indem sie unkontrollierte Entzündungsreaktionen inhibieren, besitzen sie eine wichtige Funktion in der Aufrechterhaltung der immunologischen Homöostase des Gastrointestinaltrakts [175]. Bei CED ist diese Homöostase gestört, sodass es zu einer überschießenden Abwehrreaktion gegenüber apathogenen Nahrungsbestandteilen und Mikrobiota kommt [3]. Einen Hinweis auf die besondere Bedeutung der Makrophagen bei dieser Dysregulation stellt die Identifikation einer CD14<sup>+</sup> Makrophagenpopulation in der Lamina propria von CED-Patienten dar, die im Gegensatz zu den intestinalen Makrophagen von Gesunden vermehrt pro-inflammatorische Zytokine sezerniert [28]. Der anti-inflammatorische Effekt der HDAC-Inhibitoren im DSS-Kolitis-Modell der Maus [176] rückte die HDACs als mögliche therapeutische Zielstrukturen von entzündlichen Darmerkrankungen in den Fokus. Da HDAC-Inhibitoren die Polarisierung von aus dem Knochenmark der Maus isolierten Makrophagen beeinflussen und einen anti-inflammatorischen Effekt in diesen Zellen besitzen [139], könnte gerade die immunregulatorische Funktion der HDACs in Makrophagen ein wichtiger Faktor in der Pathogenese von CED sein. Aufgrund der globalen HDAC-Inhibitoren blieb die Bedeutung einzelner HDACs für die Immunreaktion von Makrophagen bisher weitgehend unklar, jedoch weist die gesteigerte Expression der induzierbaren NO-Synthetase durch Überexpression der HDAC5 in RAW 264.7-Zellen [117] auf eine besondere Funktion dieser HDAC in der Immunantwort von Makrophagen hin.

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, wie die Expression der HDAC5 in Makrophagen reguliert wird und in welcher Weise HDAC5 die Immunantwort von Makrophagen beeinflusst. Dazu wurde zunächst die Expression der HDAC5 in murinen, aus dem Knochenmark isolierten Makrophagen, in humanen M1- und M2-Makrophagen sowie in den für die weiteren funktionellen Analysen verwendeten Makrophagenzelllinien RAW 264.7 und U937 nachgewiesen. Anschließend wurde der Einfluss von inflammatorischen Stimuli auf die Expression der HDAC5 sowie die

Expression der anderen HDAC-Subtypen in den murinen RAW 264.7-Makrophagen charakterisiert. Der Effekt einer Modulation der HDAC5-Expression auf die Produktion inflammatorischer Faktoren wurde durch Überexpression und *knock down* der HDAC5 in den RAW 264.7-Zellen untersucht. Dabei wurde die Notwendigkeit einer intakten HDAC-Domäne durch Mutation des HDAC5-Plasmides überprüft. Zur Identifizierung von Signalwegen, die die regulatorische Funktion der HDAC5 vermitteln, wurde die Aktivität von NFκB sowie die Expression der anderen HDAC-Subtypen nach Modulation der HDAC5-Expression in den RAW 264.7-Zellen analysiert. Die Übertragbarkeit der Ergebnisse aus den murinen RAW 264.7-Zellen auf humane Makrophagen wurde durch einen *knock down* der HDAC5 in der humanen U937-Zelllinie überprüft. Auf Grundlage dieser Daten sollten neue Erkenntnisse über die Funktion der HDAC5 in Makrophagen und ihre mögliche Relevanz als therapeutische Zielstruktur bei CED gewonnen werden.

## **5.2 HDAC5 wird in murinen und humanen Makrophagen exprimiert**

HDAC5 wird aufgrund seiner phylogenetischen Ähnlichkeit zu der HDA-A1 zu den HDACs der Klasse II gezählt [77]. Im Unterschied zu den sonstigen HDAC-Klassen können HDACs der Klasse II zwischen dem Kern und dem Zytoplasma pendeln [79-84]. Neben der Deacetylierung von Histonen, welche die Bindung von Transkriptionsfaktoren an die DNA durch Kompaktierung der DNA reguliert, können die HDACs auch mit anderen Nicht-Histon-Proteinen interagieren. So interagiert HDAC5 beispielsweise mit *myocyte enhancer factor 2A*, *GATA-binding factor 1*, *B-cell lymphoma 6 protein* und HDAC3 [77, 177-179].

Eine Veränderung der HDAC5-Expression spielt bei der Entstehung chronisch entzündlicher Erkrankungen eine wichtige Rolle. In der Maus ist die HDAC5-Expression auf mRNA-Ebene im Kolongewebe bei einer DSS-Kolitis gesteigert [107]. Im Lungengewebe von COPD-Patienten ist die mRNA-Expression der HDAC5 vermindert [122]. Da zudem die Krankheitsaktivität einer COPD mit der Expression der HDAC5 in den humanen Alveolarmakrophagen im direkten Zusammenhang steht, erscheint die Expression der HDAC5 in Makrophagen für die Entstehung von chronischen Entzündungsprozessen im Menschen von besonderer Relevanz [121].

Voraussetzung für eine funktionelle Bedeutung der HDAC5 in der Immunantwort von Makrophagen ist eine relevante Expression des Enzyms in diesen Zellen. Primäre Makrophagen aus dem Peritoneum und dem Knochenmark der Maus, humane alveoläre Makrophagen, die murinen Makrophagen-Zelllinien J774 und RAW 264.7 sowie die humane, monozytäre Zelllinie U937 exprimieren HDAC5 auf mRNA-Ebene [118, 121, 180, 181]. Diese Befunde wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit für primäre Makrophagen aus dem Knochenmark der Maus bestätigt. Zudem wurde erstmals die Expression der HDAC5 in humanen, *in vitro* aus peripheren CD14<sup>+</sup> mononukleären Zellen generierten M1- und M2-Makrophagen auf mRNA-Ebene nachgewiesen (Abb. 1). Die murine RAW 264.7-Zelllinie exprimiert auch auf Proteinebene relevante Mengen der HDAC5 [182]. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Expression des HDAC5-Proteins in RAW 264.7-Zellen bestätigt und erstmals auch für U937-Zellen gezeigt (Abb. 2). Dabei war die HDAC5-Expression in den murinen RAW 264.7-Zellen höher als in den humanen U937-Zellen. Eine mögliche Erklärung für diesen Unterschied liegt in der Differenzierung der beiden Zelllinien. RAW 264.7-Zellen exprimieren die klassischen Makrophagenoberflächenmarker F4/80, CD11b und CD14, die die Adhärenz, Phagozytose und Erkennung von LPS durch Makrophagen ermöglichen, und besitzen somit wichtige Eigenschaften von primären Makrophagen [183]. Undifferenzierte U937-Zellen exprimieren hingegen weder CD11b noch CD14. Durch eine Stimulation mit LPS oder Vitamin D3 kann die Expression von CD14 jedoch induziert werden und eine Stimulation mit PMA bewirkt eine Expression von CD11b [118]. Eine Differenzierung der monozytären U937-Zellen zu einem Makrophagen-ähnlichen Phänotyp ist daher möglich, die undifferenzierten U937-Zellen weisen jedoch deutliche Unterschiede zu reifen Makrophagen auf. Die vermehrte Expression der HDAC5 in den differenzierten RAW 264.7-Zellen im Vergleich zu den undifferenzierten U937-Zellen könnte somit auf einen möglichen Zusammenhang zwischen der HDAC5-Expression und Eigenschaften differenzierter Makrophagen wie z.B. der LPS-Erkennung hinweisen. Diese Hypothese wird zusätzlich dadurch bekräftigt, dass die Expression der HDAC5 durch eine Differenzierung von U937-Zellen mittels Vitamin D3 oder PMA gesteigert wird [118]. Die genregulatorische Funktion der HDACs durch die Kompaktierung der DNA könnte die veränderte HDAC5-Expression in unterschiedlichen Differenzierungsstufen von monozytären Zellen erklären. Allerdings spielt eventuell nicht nur die Expression, sondern auch die intrazelluläre Lokalisation eine Rolle bei

der Differenzierung von Monozyten, da HDAC5 als Mitglied der HDACs der Klasse II sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma vorliegen kann. So tritt bei der Differenzierung von Myozyten ein Transport der HDAC5 vom Zellkern in das Zytoplasma auf [184]. Der Transport der HDAC5 zwischen Zellkern und Zytoplasma wird durch Phosphorylierung gesteuert. Die Funktion der HDAC5 wird also nicht nur durch die Neusynthese des Enzyms, sondern auch durch posttranslationale Modifikation reguliert [185].

Die weiteren Untersuchungen zur immunregulatorischen Funktion der HDAC5 in Makrophagen wurden in der murinen RAW 264.7- und der humanen U937-Zelllinie durchgeführt. Diesbezüglich stellt sich die Frage, in wie weit diese Zelllinien als Modell für humane und murine Makrophagen dienen können. Im Vergleich zu Makrophagen, die aus dem Knochenmark von Mäusen isoliert werden, exprimieren RAW 264.7-Zellen vermehrt CD14 [183]. Die primären murinen Makrophagen weisen wiederum eine höhere Expression von CD11c, CD40 und *major histocompatibility complex* (MHC) II auf [183]. Da CD14 die Erkennung von LPS ermöglicht [186], könnten RAW 264.7-Zellen somit auf eine LPS-Stimulation empfindlicher reagieren als die primären Zellen. Dies wäre jedoch für die Detektion von geringfügigen Effekten durch eine LPS-Stimulation vorteilhaft. Da in der vorliegenden Arbeit keine Interaktion mit anderen Zelltypen untersucht wurde, war die unterschiedliche Expression von CD40, das für die Aktivierung von Makrophagen durch T-Zellen notwendig ist [187], und MHC II, das eine Präsentation von extrazellulären Antigenen zur Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T Zellen ermöglicht [188], vernachlässigbar. Ebenso konnte auch die verminderte Expression von CD11c außer Acht gelassen werden, da weder die Adhärenz der Zellen evaluiert wurde, noch eine Stimulation mit Fibrinogen erfolgte [189]. Weil die U937-Zellen in den weiterführenden Experimenten mit PMA und anschließend mit LPS stimuliert wurden, wodurch die Expression von CD11b und CD14 induziert wird [118], konnte auch für diese Zelllinie eine hinreichende phänotypische Ähnlichkeit zu Makrophagen angenommen werden. Sowohl die murine RAW 264.7-Zelllinie, die durch Infektion mit dem *Abelson murine leukemia virus* immortalisiert wurde [141], als auch die humane U937-Zelllinie, die einem histiozytären Lymphom entstammt [142], besitzen maligne Eigenschaften. Aufgrund der deutlich erhöhten mRNA-Expression der HDAC5 in humanen kolorektalen Adenomen [190], humanen akuten lymphatischen Leukämiezellen vom B-Zell-

Typ [191] und humanen Medulloblastomen [192] sowie der erniedrigten mRNA-Expression der HDAC5 in humanen akuten myeloischen Leukämiezellen [26] könnte die Expression der HDAC5 durch die Malignität der beiden Zelllinien gegenüber primären Makrophagen verändert sein. Unterstützend für diese Hypothese wurde ein Unterschied in der Expression der HDAC5 während der Differenzierung von primären, aus dem Blut von Menschen isolierten Makrophagen und U937-Zellen auf mRNA-Ebene festgestellt [118]. Nichts desto trotz bietet die Untersuchung von immunregulatorischen Prozessen an den Zelllinien einige Vorteile: Die oligoklonale Abstammung der murinen RAW 264.7- sowie der humanen U937-Zelllinie ermöglicht eine im Vergleich zu primären Zellen verbesserte Reproduzierbarkeit von Experimenten. So wurde in aus dem Blut gesunder Probanden isolierten Makrophagen bereits für HDAC7 und HDAC9 eine deutlich unterschiedliche Expression nachgewiesen [118]. Eine Kontamination mit anderen Zelltypen, die bei der Isolation von primären Zellen auftreten kann, ist bei der Kultur von Zelllinien unwahrscheinlich. Zudem kann aufgrund der Immortalisierung der Zelllinien eine dauerhafte Zellkultur durchgeführt werden, die durch regelmäßiges Passagieren der Zellen eine Synchronisation der Zellen ermöglicht. Dadurch entsteht eine gegenüber primären Zellen homogenere Zellpopulation, die eine bessere Vergleichbarkeit ermöglicht. Zudem sind die malignen Zelllinien im Vergleich zu primären Zellen robuster und können dadurch suffizienter manipuliert werden. So ist beispielsweise eine Transfektion von monozytären Zelllinien mittels Elektroporation mit einer höheren Effizienz möglich als die Transfektion von primären Monozyten, da die malignen Zelllinien eine höhere Spannung und längere Dauer von Strompulsen tolerieren [153].

### **5.3 Pro-inflammatorische Faktoren regulieren die HDAC5-Expression in Makrophagen**

Aufgrund der Beeinflussung basaler Zellprozesse wie der DNA-Reparatur, der Replikation, des Metabolismus, der Apoptose, der Proteinfaltung und intrazellulärer Signalwege durch verschiedene HDACs [69] erscheint eine fein abgestimmte Regulation der HDAC-Expression notwendig. Die Immunantwort von Makrophagen wird durch pro- und anti-inflammatorische Stimuli reguliert [29]. Um einen ersten Hinweis auf die Bedeutung der HDAC5 in Makrophagen zu erhalten, wurde daher die

Regulation der HDAC5-Expression durch inflammatorische Faktoren in RAW 264.7-Zellen als Modell für murine Makrophagen in der vorliegenden Arbeit analysiert.

LPS ist Bestandteil der Zellmembran von Gram-negativen Bakterien und bewirkt als Endotoxin eine pro-inflammatorische Immunantwort durch Makrophagen. Nach Bildung eines Komplexes mit dem löslichen LPS-Rezeptor bindet es an den Rezeptorkomplex aus CD14, TLR4 und dem *lymphocyte antigen 96*-Rezeptor auf der Zelloberfläche von monozytären Zellen [33, 186]. Dies löst die Aktivierung des MyD88 aus. Die weitere Signalkaskade führt über eine Aktivierung der Interleukin-1-assoziierten Kinasen 1 und 4 zu Phosphorylierung des Inhibitors von  $\kappa$ B (I $\kappa$ B). Dadurch wird NF $\kappa$ B aus dem Komplex mit dem I $\kappa$ B freigesetzt und transloziert vom Zytoplasma in den Zellkern, wo es als Transskriptionsfaktor die Produktion von pro-inflammatorischen Faktoren wie z.B. TNF, IL-6, MCP-1 und NO induziert [193]. Durch die Produktion der pro-inflammatorischen Zytokine ist LPS an der Aufrechterhaltung von chronischen Entzündungsreaktionen beteiligt. Die Bedeutung für die Entstehung von CED wird durch die Induktion einer ulzerierenden Kolitis durch replikative Applikation von LPS im Hasenmodell verdeutlicht [194].

In aus dem Knochenmark von Mäusen isolierten Makrophagen wird die HDAC5-Expression auf mRNA-Ebene nach vier und sechs Stunden Kultur in Gegenwart von 10 ng/ml LPS [195] sowie nach drei und sechs Stunden in Gegenwart von 1  $\mu$ g/ml LPS vermindert [196]. Bei einer Inkubation über zwölf Stunden mit 1  $\mu$ g/ml LPS wird die Expression der HDAC5 je nach dem Alter der Tiere unterschiedlich reguliert: So ist die mRNA-Expression in Zellen aus älteren Mäusen auch nach zwölf Stunden weiterhin reduziert, wohingegen in Zellen aus jüngeren Mäusen das Niveau der basalen mRNA-Expression erreicht wird [196]. Eine Stimulation der primären Makrophagen über 24 Stunden führt sowohl bei einer Konzentration von 10 ng/ml als auch bei 1  $\mu$ g/ml zu einer deutlich erhöhten HDAC5-Expression [195, 196]. In RAW 264.7-Zellen ist die mRNA-Expression der HDAC5 durch Kultur in Gegenwart von 100 ng/ml LPS über 18 Stunden deutlich reduziert [180].

Die bisher in primären murinen Zellen gezeigte Verminderung der HDAC5-Expression auf mRNA-Ebene durch eine Stimulation mit LPS über bis zu sechs Stunden wurde in der vorliegenden Arbeit für die RAW 264.7-Zelllinie durch eine

Inkubation mit 1 µg/ml LPS über sieben Stunden bestätigt (Abb. 3A und B). Die gleichartige Veränderung der HDAC5-Expression lässt Rückschlüsse von der Regulation und Funktion der HDAC5 in der RAW 264.7-Zelllinie auf die primären Zellen sinnvoll erscheinen. Im Unterschied zu den primären Makrophagen aus dem Knochenmark von Mäusen zeigte sich bei einer Kultur in Gegenwart von LPS über 24 Stunden eine dem Ausgangsniveau entsprechende HDAC5-Expression auf mRNA-Ebene (Abb. 3C und D). Eine mögliche Erklärung dafür könnte die vermehrte Expression von CD14 durch die RAW 264.7-Zelllinie gegenüber den primären Zellen sein [183]. Zudem wurden die Zellen in der vorliegenden Arbeit im Gegensatz zu den bisherigen Veröffentlichungen nicht mit Zellen zum Zeitpunkt Null verglichen, sondern mit unstimulierten Zellen, die unter den gleichen Bedingungen wie die stimulierten Zellen kultiviert wurden. Die größere Zelldichte der über 24 Stunden kultivierten Zellen im Vergleich zu den Zellen zum Zeitpunkt Null könnte eine Zunahme der in Apoptose befindlichen Zellen bewirken. Da die Induktion einer Apoptose zu einer vermehrten Expression der HDACs führt [197], wäre dies ebenfalls eine mögliche Erklärung für den Unterschied in der Expressionshöhe nach 24 Stunden LPS-Stimulation.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die frühe Kinetik der HDAC5-Expression in RAW 264.7-Zellen auf mRNA-Ebene nach Stimulation mit LPS bis zu einer Stunde untersucht. Dabei war die HDAC5-Expression nach einer LPS-Stimulation bis zu 20 min deutlich gesteigert (Abb. 4). Somit bewirkte eine Stimulation mit 1 µg/ml LPS von RAW 264.7-Zellen zunächst eine rasche Erhöhung der HDAC5-Expression nach 20 min, die im Anschluss von einer ausgeprägten Verminderung der Expression über bis zu sieben Stunden gefolgt war, bevor nach 24 Stunden wieder die basale HDAC5-Expression erreicht wurde. Eine mögliche Erklärung für diesen sinusoidalen Verlauf der HDAC5-Expression wäre eine Regulation des TLR4-Signalweges durch LPS selbst. In RAW 264.7 Zellen führt eine Stimulation mit 100 ng/ml LPS zu einer Verminderung der mRNA-Expression von TLR4 mit einem Maximum nach zwei Stunden [198]. Zudem induziert LPS die Expression von Inhibitoren des TLR4-Signalwegs wie dem MyD88-Antagonisten MyD88s [199], der Interleukin-1 Rezeptor assoziierten Kinase (IRAK) M, die die Phosphorylierung der IRAK inhibiert [200], sowie des *suppressor of cytokine signaling proteins 1*, das ebenfalls die IRAK inhibiert [201]. Somit könnte die verminderte HDAC5-Expression in einer reduzierten

Ansprechbarkeit der Zellen auf eine LPS-Stimulation begründet sein. Diese könnte wiederum zur Ausbildung einer Toleranz der Makrophagen gegenüber Endotoxinen zur Prophylaxe einer überschießenden Immunantwort beitragen.

Eine weitere Erklärung für die Regulation der HDAC5-Expression wäre ein Rückkopplungsmechanismus, der nach der raschen Hochregulation der HDAC5 initiiert wird, um eine zu hohe und langanhaltende HDAC5-Expression zu verhindern. Ein solcher Rückkopplungsmechanismus besteht für die HDAC4 in der murinen Mikroglia-Zelllinie BV2: In diesen Zellen ist die LPS-induzierte Expression proinflammatorischer Zytokine von der HDAC4-Expression abhängig. Eine längerfristige Stimulation mit LPS über 18 bis 24 Stunden führt jedoch zu einer verminderten HDAC4-Proteinmenge. Dabei wird die mRNA-Expression der HDAC4 durch die LPS-Stimulation nur gering reduziert. Die verminderte HDAC4-Proteinmenge resultiert vielmehr aus einem Abbau des Enzyms durch die Caspase 3 [116].

Ein möglicher autokriner Mediator eines Rückkopplungsmechanismus für die HDAC5 ist TNF $\alpha$ , das bereits nach einer einstündigen LPS-Stimulation von aus dem murinen Peritoneum angereicherten Makrophagen in hoher Konzentration im Zellüberstand nachgewiesen werden kann [202]. Auch in aus dem Knochenmark von Mäusen isolierten Makrophagen führt eine einstündige LPS-Stimulation zu einer deutlich vermehrten TNF $\alpha$ -Expression auf mRNA-Ebene [203]. Ein Rückkopplungsmechanismus von TNF $\alpha$  auf die Proteinmenge der HDACs ist für HDAC1 bekannt: So führt einerseits ein *knock down* der HDAC1 zu einer verminderten Expression von TNF $\alpha$  [19], sodass eine Abhängigkeit der Expression von TNF $\alpha$  von der Expression der HDAC1 angenommen werden kann. Andererseits bewirkt eine Stimulation von Mammakarzinomzellen sowie immortalisierten Mamma-Zellen mit TNF $\alpha$  eine Depletion der HDAC1 durch Proteinabbau infolge Ubiquitinierung und vermindert damit die Verfügbarkeit des Enzyms. Dabei bleibt die mRNA-Expression und Proteinsynthese des Enzyms unverändert [101]. Ein direkter Regulationsmechanismus in Makrophagen wurde bisher jedoch nicht gezeigt. In Bezug auf HDACs der Klasse II bewirkt eine Inkubation von humanen, trachealen glatten Muskelzellen mit TNF $\alpha$  einen Export der HDAC4 aus dem Nukleus [204, 205]. Ein Einfluss von TNF $\alpha$  auf die Expression der HDAC5 ist bisher nicht beschrieben worden. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss einer Inkubation mit TNF $\alpha$  auf die mRNA-Expression der HDAC5 in der RAW 264.7-Zelllinie untersucht. Die HDAC5-Expression war nach Stimulation mit TNF $\alpha$

unverändert (Abb. 5), sodass ein autokriner Rückkopplungsmechanismus über die Sekretion von TNF $\alpha$  als Ursache für die Verminderung der HDAC5-Expression unwahrscheinlich ist.

Aufgrund des Einflusses von LPS auf die Expression der HDAC5 in RAW 264.7-Zellen wurde in der vorliegenden Arbeit überprüft, ob andere pro- oder anti-inflammatorische Stimuli ebenfalls regulatorisch auf die mRNA-Expression der HDAC5 Einfluss nehmen. Eine Stimulation von RAW 264.7-Zellen mit IFN $\gamma$  bzw. CpG-Oligonukleotiden über fünf Stunden reduzierte die Expression der HDAC5 deutlich. Andere Stimuli wie IL-4, IL-6, IL-13, M-CSF, GM-CSF und MCP-1 veränderten die Expression der HDAC5 im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen hingegen nicht (Abb. 6).

IFN $\gamma$  wird insbesondere von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie von natürlichen Killer-Zellen sezerniert. Es aktiviert über die IFN $\gamma$ -Rezeptoren 1 und 2 den Janus-Kinase-STAT-Signalweg [206]. Eine Kostimulation mit IFN $\gamma$  und LPS verstärkt die Immunantwort von RAW 264.7-Zellen im Vergleich zu einer alleinigen Stimulation mit LPS [207]. Zudem verringert eine Inkubation mit IFN $\gamma$  die notwendige LPS-Konzentration zur Induktion einer mRNA-Expression von TNF $\alpha$  in RAW 264.7-Zellen [208] und steigert die Reaktion auf CpG-Oligonukleotide von aus dem murinen Knochenmark isolierten Makrophagen sowie RAW 264.7-Zellen [209]. Eine mögliche Begründung dafür ist, dass eine Stimulation mit IFN $\gamma$  die Expression des TLR4 in aus dem Blut von Menschen isolierten Makrophagen [210] sowie des TLR9 in RAW 264.7-Zellen erhöht [211]. Zudem wird die Expression von MyD88 sowie von IRAK in aus dem Blut von Menschen isolierten Makrophagen durch eine Inkubation mit IFN $\gamma$  vermehrt [210]. In RAW 264.7-Zellen steigert IFN $\gamma$  die Aktivierung von NF $\kappa$ B und beschleunigt dessen DNA-Bindung [212]. Zusammenfassend potenziert IFN $\gamma$  somit die durch LPS- und CpG-Oligonukleotide induzierten Signalwege. Dies spiegelt sich auch in einer gesteigerten Produktion von NO und IL-12 nach Stimulation mit IFN $\gamma$  im Vergleich zu einer alleinigen LPS-Stimulation durch aus dem Knochenmark von Mäusen isolierten Makrophagen wider [213]. Da eine Stimulation mit IFN $\gamma$  über fünf Stunden ebenso wie die Stimulation mit CpG-Oligonukleotiden und LPS zu einer verminderten Expression der HDAC5 in RAW 264.7-Zellen führte, erscheint ein Synergismus dieser Faktoren auch im Hinblick auf die Regulation der HDAC5-Expression denkbar.

CpG-Oligonukleotide sind in der bakteriellen DNA im Vergleich zur DNA von Säugetieren überproportional häufig vertreten. Sie bewirken eine Aktivierung des TLR9 auf der Zellmembran von monozytären Zellen [214]. Die Signalkaskade von TLR9 beinhaltet ebenfalls die Aktivierung des MyD88 und führt somit wie eine Stimulation von TLR4 zu einer Aktivierung von NFκB [215]. Eine kurzfristige Stimulation mit CpG-Oligonukleotiden über ein bis drei Stunden steigert die TNFα-Expression und -Sekretion nach anschließender LPS-Stimulation in RAW 264.7-Zellen. Eine längere Stimulationsdauer von sechs bis neun Stunden vermindert hingegen die Expression und Sekretion von TNFα in diesen Zellen [216]. Die Verminderung der HDAC5-Expression durch eine Inkubation mit CpG-Oligonukleotiden über fünf Stunden könnte ein möglicher Mediator für den Effekt von CpG-Oligonukleotiden auf die Expression von TNFα in RAW 264.7-Zellen sein, da die reduzierte Expression der HDAC5 eine Stunde vor der verminderten Expression von TNFα in RAW 264.7-Zellen nach Stimulation mit IFNγ auftritt. Weil darüber hinaus CpG-Oligonukleotide ebenso wie IFNγ und LPS eine gesteigerte Aktivität von NFκB in Makrophagen induzieren [193, 212, 215], erscheint gerade ein immunregulatorischer Zusammenhang zwischen der Expression der HDAC5 und der Aktivität von NFκB in Makrophagen wahrscheinlich. Somit könnte ein Einfluss der HDAC5 auf die Aktivierung des NFκB-Signalweges bestehen, der wiederum die Expression pro-inflammatorischer Faktoren wie z.B. TNFα und MCP-1 in RAW 264.7-Zellen reguliert.

#### **5.4 Die Modulation der HDAC 5-Expression wirkt regulierend auf die Sekretion pro-inflammatorischer Faktoren durch Makrophagen**

Da LPS, CpG-Oligonukleotide und IFNγ die Expression der HDAC5 regulieren und alle drei Stimulantien eine Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine wie z.B. TNFα durch RAW 264.7-Zellen induzieren [217, 218], wurde in der vorliegenden Arbeit nach dem Effekt einer aktiven Modulation der HDAC5-Expression in RAW 264.7-Zellen auf die Sekretion inflammatorischer Zytokine gefragt.

Der HDAC-Inhibitor KBH-A42 inhibiert in RAW 264.7-Zellen die Produktion inflammatorischer Zytokine [219]. Einen Hinweis auf eine immunregulatorische Funktion der HDACs der Klasse II gibt die Abhängigkeit der Expression pro-

inflammatorischer Zytokine von der HDAC4-Expression in der murinen Mikroglia-Zelllinie BV2 [116]. Dass zudem eine Überexpression der HDAC5 die Expression der induzierbaren NO-Synthetase in RAW 264.7-Zellen steigert [117], weist auf eine pro-inflammatorische Funktion dieser HDAC in Makrophagen hin.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals ein direkter Zusammenhang zwischen der Expression der HDAC5 und der Produktion von TNF $\alpha$  und MCP-1 in RAW 264.7-Zellen gezeigt werden. Eine vermehrte HDAC5-Expression bewirkte eine gesteigerte Produktion von TNF $\alpha$  und MCP-1 (Abb. 9A und B). Eine verminderte Expression hatte einen gegenteiligen Effekt (Abb. 14A und B). Eine simultane Transfektion von pHDAC5 und der HDAC5-spezifischen siRNA in den RAW 264.7-Zellen (Abb. 16) verdeutlichte darüber hinaus, dass die Sekretion der pro-inflammatorischen Zytokine TNF $\alpha$  sowie MCP-1 von der intrazellulären HDAC5-Konzentration abhängig war. Die Abwesenheit der funktionellen Überexpression der HDAC5, unabhängig davon ob diese durch das Fehlen des Gesamtproteins in Folge der Verschiebungen des Leserasters im Transgen oder durch die Inaktivierung der HDAC-Domäne erreicht wurde, führte zu einer signifikant reduzierten TNF $\alpha$ -Produktion im Vergleich zur Transfektion mit dem Ausgangsplasmid, das für die intakte murine HDAC5 kodierte (Abb. 10). Daher kann angenommen werden, dass die vermehrte Sekretion der pro-inflammatorischen Zytokine TNF $\alpha$  und MCP-1 tatsächlich auf der gesteigerten Expression der HDAC5 beruht und von der intakten HDAC5-Domäne abhängig ist. Die Produktion des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 wurde durch eine gesteigerte HDAC5-Expression ebenfalls vermehrt (Abb. 9C). Da die verminderte Expression der HDAC5 jedoch keinen Effekt auf die Produktion von IL-10 hatte (Abb. 14C), könnte dies auf einen immunregulatorischen Prozess hinweisen, der im Falle einer vermehrten Expression der HDAC5 eine überschießende pro-inflammatorische Immunantwort verhindert und eine Gegenregulation einleitet. Eine solche Gegenregulation durch IL-10 wäre im Falle einer verminderten HDAC5-Expression nicht notwendig. Die Konzentration von IL-6 wurde im Zellüberstand weder durch die verminderte noch durch die erhöhte Expression der HDAC5 verändert (Abb. 9D und 14D). Dies verdeutlicht, dass eine gesteigerte HDAC5-Expression nicht unspezifisch zu einer erhöhten Ausschüttung aller von RAW 264.7-Zellen sezernierten Zytokine führt, sondern vielmehr selektiv die Sekretion einzelner inflammatorischer Zytokine reguliert.

Eine Überexpression der HDAC5 ohne nachfolgende LPS-Stimulation bewirkte keine Produktion von TNF $\alpha$  oder MCP-1 (Daten nicht gezeigt), daher kann postuliert werden, dass HDAC5 nicht unabhängig vom TLR-4-Signalweg die Immunantwort von Makrophagen reguliert, sondern den TLR4-Signalweg beeinflusst. Ein derartiger regulatorischer Effekt auf den TLR4-Signalweg in Makrophagen ist für die HDAC7 bekannt, die ebenfalls zur Klasse II der HDACs gehört. So bewirkt eine Überexpression der HDAC7 in RAW 264.7-Zellen durch eine vermehrte Aktivierung des HIF1 $\alpha$  eine gesteigerte Expression TLR4-abhängiger, pro-inflammatorischer Gene [220]. Da HDAC5 ebenfalls die Aktivität des HIF1 $\alpha$  durch Blockade der Bindungsstelle für den *factor inhibiting* HIF1 $\alpha$  steigert [221], könnte HDAC5 wie HDAC7 über diesen Signalweg die Expression pro-inflammatorischer Gene induzieren.

In humanen, monozytären THP-1-Zellen wird die TNF $\alpha$ -Promotoraktivität durch Überexpression der HDAC5 reduziert [119]. Um eine Übertragbarkeit der in den murinen RAW 264.7-Zellen festgestellten Zusammenhänge zwischen HDAC5 und dem TLR4-Signalweg auf humane Makrophagen zu prüfen, wurde in der vorliegenden Arbeit der Effekt eines HDAC5-*knock down* auf die Produktion von TNF $\alpha$  untersucht. Dabei zeigte sich wie schon in den murinen RAW 264.7-Zellen eine Verminderung der TNF $\alpha$ -Konzentration im Zellüberstand durch die erniedrigte HDAC5-Expression (Abb. 21). Somit kann von einem ähnlichen regulatorischen Effekt der HDAC5 in den humanen Zellen ausgegangen werden. Die Reduktion der TNF $\alpha$ -Promotoraktivität durch Überexpression der HDAC5 in THP-1-Zellen könnte darauf hinweisen, dass die HDAC5 nicht die mRNA-Expression der pro-inflammatorischen Zytokine steigert, sondern deren Proteinabbau reguliert. Ein derartiger Regulationsmechanismus ist für die Regulation des Proteinabbaus des nukleären Rezeptors 77 durch die HDAC1 in humanen Zervixkarzinomzellen bekannt [222]. Eine weitere Erklärung für die divergenten Effekte in den U937- und THP-1-Zellen durch Modulation der HDAC5-Expression könnte im Grad der Differenzierung der beiden Zelllinien liegen. U937-Zellen entstammen einem histiozytären Lymphom und besitzen somit einen höheren Differenzierungsgrad [142] als THP-1-Zellen aus einer undifferenzierten Leukämie [223]. Dies könnte wiederum auf einen Zusammenhang zwischen der Differenzierung von Makrophagen und der regulatorischen Funktion der HDAC5 hinweisen.

Humane Makrophagen werden anhand der Sekretion von Zytokinen in einen pro- und anti-inflammatorischen Phänotyp eingeteilt [12, 13]. Wie die primären humanen Makrophagen erscheinen auch die RAW 264.7- und U937-Zellen polarisierbar. So sezernierten unstimulierte RAW 264.7-Zellen keine relevanten Zytokinmengen (Daten nicht gezeigt). Ebenso sezernieren auch U937-Zellen, die ausschließlich mit PMA differenziert wurden, nur geringe Zytokinmengen, wobei die Konzentration von IL-10 im Zellüberstand höher ist als die von TNF $\alpha$  [224]. Eine zusätzliche Stimulation mit LPS führt in beiden Zelllinien zu einer deutlich erhöhten TNF $\alpha$ -Sekretion [225, 226]. Die LPS-Stimulation bewirkt somit in beiden Zelllinien eine Differenzierung zu einem pro-inflammatorischen Phänotyp. Diese Eigenschaft beider Zelllinien unterstreicht die Aussagekraft des Modellsystems. Da eine Überexpression der HDAC5 in den RAW 264.7-Zellen eine vermehrte TNF $\alpha$ - und MCP-1-Produktion bewirkte, scheint die HDAC5 eine Differenzierung zu einem pro-inflammatorischen Phänotyp zu verstärken. Die gesteigerte Expression der HDAC5 bei der Differenzierung von U937-Zellen mit PMA und LPS verweist zudem auf einen ähnlichen Mechanismus in humanen Makrophagen [118].

Die Relevanz des hier beschriebenen Zusammenhangs zwischen der Expression der HDAC5 und der Produktion von TNF $\alpha$  und MCP-1 für chronische Entzündungen wird anhand der Funktion der pro-inflammatorischen Faktoren für die Aufrechterhaltung von Immunreaktionen verdeutlicht. MCP-1 bewirkt als Chemokin eine Migration von Monocyten und T-Zellen in Richtung der Entzündung [227]. TNF $\alpha$  initiiert eine systemische Entzündungsreaktion und bewirkt als Pyrogen die Entstehung von Fieber [228]. Die klinische Bedeutung von TNF $\alpha$  für Inflammationsprozesse zeigt sich in dem therapeutischen Effekt von TNF $\alpha$ -Antikörpern bei chronisch entzündlichen Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis oder CED [229, 230].

## **5.5 HDAC 5 beeinflusst die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine durch Regulation des NF $\kappa$ B-Signalweges und Interaktion mit HDAC 3**

Sowohl die Expression von TNF $\alpha$  als auch von MCP-1 wird in RAW 264.7-Zellen durch den Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B reguliert [231, 232]. Da die Modulation der HDAC5-Expression die Produktion dieser Zytokine beeinflusst, wurde ein regulatorischer Effekt der HDAC5 auf den NF $\kappa$ B-Signalweg vermutet. Aus diesem

Grund wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss einer Modulation der HDAC5-Expression auf die Aktivität von NFκB untersucht.

Die NFκB-Transkriptionsfaktoren bestehen aus induzierbaren Hetero- und Homodimeren von Proteinen der Rel-Familie. Das Heterodimer aus p50 und p65 liegt in inaktivierter Form im Zytoplasma an den IκB gebunden vor. Eine pro-inflammatorische Stimulation der Zelle beispielsweise durch LPS oder TNFα bewirkt eine Phosphorylierung des IκB. Daraufhin wird das Heterodimer aus p50 und p65 freigesetzt und transloziert in den Nukleus. Dort bindet es an die DNA und bewirkt als Transkriptionsfaktor die Expression pro-inflammatorischer Gene [233].

Eine Regulation der Aktivität von NFκB ist bisher insbesondere für HDACs der Klasse I beschrieben worden. Eine Deacetylierung von p65 durch die HDAC3 induziert die Bindung des IκB an p65 und bewirkt dadurch den Export des p50-p65-Heterodimers aus dem Zellkern in der Fibroblastenzelllinie Cos-7, in der humanen embryonalen Nierenzelllinie HEK293 und der humanen Epithelzelllinie eines Zervixkarzinoms HeLa [234]. HDAC1 und HDAC2 reduzieren die Aktivität von NFκB in humanen Epithelzellen eines Zervixkarzinoms. Dabei assoziiert HDAC1 direkt mit p65. HDAC2 inhibiert NFκB hingegen durch eine Bindung an HDAC1 [235]. Eine Acetylierung von p65 ist an verschiedenen Lysin-Seitenketten möglich. Dabei scheint für die Regulation der NFκB-Aktivität entscheidend, welche Lysin-Seitenkette acetyliert bzw. deacetyliert wird. So bewirkt eine Acetylierung an den Lysin-Seitenketten 218, 221 und 310 eine vermehrte NFκB-Aktivität in der humanen embryonalen Nierenzelllinie HEK293 [236, 237]. Eine Acetylierung der Lysin-Seitenketten 122 und 123 führt hingegen zu einer erhöhten Bindung des IκB, dem Export des NFκB-Komplexes und einer verminderten Transkription NFκB-abhängiger Gene in HEK- bzw. HeLa-Zellen [238]. HDAC2 und 3 assoziieren mit p65 in diesen Zellen, jedoch besitzt nur HDAC3 die Fähigkeit, p65 zu deacetylieren und damit die Transskription pro-inflammatorischer Zytokine zu steigern [238]. Die Bedeutung dieses regulatorischen Einflusses der HDACs auf die Aktivität von NFκB in Makrophagen wird dadurch verdeutlicht, dass der HDAC-Inhibitor ITF2357 in den humanen U937-Zellen zu einer Hemmung der NFκB-Aktivierung führt [239]. In RAW 264.7-Zellen geht zudem eine Hemmung der Sekretion von TNFα mit einer verminderten Aktivierung des NFκB-Signalweges sowie einer reduzierten Expression

der HDAC5 einher [180]. Dies stellt einen ersten Hinweis auf einen möglichen Zusammenhang zwischen HDAC5, der Aktivität von NFκB und der Produktion pro-inflammatorischer Zytokine in Makrophagen dar.

Ein regulatorischer Effekt der HDAC5 auf die Aktivität von NFκB in Makrophagen ist bisher nicht bekannt. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss einer modulierten HDAC5-Expression auf die Aktivität von NFκB in RAW 264.7-Zellen untersucht. Dazu wurde ein NFκB-Reporter-Assay verwendet. Dieses Verfahren detektiert die Aktivität von NFκB-abhängigen Promotoren und spiegelt somit den Endpunkt des NFκB-Signalweges wider [172]. Daher sind zwar keine direkten Rückschlüsse auf Veränderungen einzelner Bestandteile des Signalwegs, wie z.B. die Lokalisation des p65-p50-Heterodimers möglich, aber der Einfluss auf die NFκB-abhängige Genexpression und somit die Aktivität des gesamten NFκB-Signalweges kann analysiert werden. Bei einer kurzfristigen Stimulation von RAW 264.7-Zellen mit LPS über eine Stunde führte die vermehrte Expression der HDAC5 zu einer signifikant erhöhten NFκB-Aktivierung (Abb. 11A). Nach einer längeren Kultur in Gegenwart von LPS über 16 Stunden kehrte die NFκB-Aktivität wieder zu ihrem Ausgangsniveau zurück (Abb. 11B). Eine verminderte Expression der HDAC5 bewirkte keine messbare Veränderung der Aktivität von NFκB weder nach einer LPS-Stimulation über eine noch über 16 Stunden (Abb. 15). Dies könnte in den unterschiedlichen Dosisbereichen der HDAC5-Expression begründet sein: Die konstitutive Überexpression unter der Kontrolle des *immediate early*-Promotors des Zytomegalievirus erhöhte die HDAC5-Expression in den transfizierten Zellen massiv (Abb. 8A und B). Beim *knock down* war der Unterschied zur Basisexpression sehr viel geringer (Abb. 13A und B), sodass die Detektion eines Effekts eventuell nicht möglich war. Die vermehrte Aktivität von NFκB bei hoher HDAC5-Expression in RAW 264.7-Zellen weist jedoch auf eine Beteiligung des NFκB-Signalwegs an der pro-inflammatorischen Funktion der HDAC5 in Makrophagen hin. Da die Expression pro-inflammatorischer Zytokine durch NFκB reguliert wird, könnte der NFκB-Signalweg den Effekt einer modulierten HDAC5-Expression auf die Produktion von TNFα und MCP-1 vermitteln. Die klinische Relevanz dieser Ergebnisse wird dadurch betont, dass Polymorphismen des NFκB-Signalweges mit einem veränderten Ansprechen von CED-Patienten auf eine Therapie mit TNFα-Antikörpern einhergehen [71].

Funktionelle Interaktionen von verschiedenen HDACs sind insbesondere für die HDACs der Klasse I bekannt: So bilden HDAC1 und 2 gemeinsam mit den Histon-Bindungsproteinen RBBP4 und RBBP7 einen nukleären Deacetylase-Komplex, der ihre Deacetylasefunktion ermöglicht [240]. Weiterhin besteht eine Interaktion zwischen HDACs der Klasse IIa und der HDAC3: Die HDAC3 assoziiert in Jurkat-Zellen, einer humanen T-Lymphozytenzelllinie, mit HDAC4 bzw. HDAC5 [77]. Darüber hinaus vermittelt die HDAC3 die Enzymaktivität der HDAC4, 5 und 7 im Kern von HEK293-Zellen, indem sie einen Komplex mit den einzelnen HDACs, dem *silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptor* und dem *nuclear receptor co-repressor 1* bildet [241, 242]. Die HDAC10, eine HDAC der Gruppe IIb bindet ebenfalls in HEK293-Zellen an die HDAC3 [243]. Auch in Makrophagen ist bereits eine Interaktion von verschiedenen HDACs bekannt. So assoziieren in der murinen Makrophagen Zelllinie RAW 264.7 sowie in humanen THP-1-Makrophagen die HDAC6 und 11 sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma und binden gemeinsam an den IL-10-Promotor [244]. Eine Interaktion der HDAC5 mit anderen HDACs in Makrophagen wurde bisher noch nicht gezeigt.

Um eine Vermittlung des immunregulatorischen Effektes der HDAC5 in Makrophagen durch andere HDACs zu überprüfen, wurde in der vorliegenden Arbeit nach dem Einfluss einer modulierten HDAC5-Expression auf die Expression anderer HDACs in RAW 264.7-Zellen gefragt. In Bezug auf den *knock down* der HDAC5 zeigte sich eine deutliche Selektivität der HDAC5-spezifischen siRNA für HDAC5 (Abb. 19). Die Expression der HDAC9 wurde gegensätzlich zu der Expression der HDAC5 verändert. So führte eine verminderte HDAC5-Expression zu einer Steigerung der HDAC9-mRNA (Abb. 19) und eine erhöhte HDAC5-Expression zu einer Verminderung der HDAC9-mRNA (Abb. 18). Die Expression der HDAC3 wurde hingegen parallel zu der Expression der HDAC5 moduliert, sodass eine erhöhte HDAC5-Expression in einer Steigerung der HDAC3-mRNA (Abb. 18) resultierte und umgekehrt (Abb. 19). Somit konnte ein regulatorischer Effekt der HDAC5-Expression auf die Expression der HDAC3 und 9 in RAW 264.7-Zellen angenommen werden. Die Expression anderer HDACs wurde weder parallel noch entgegengesetzt zu der HDAC5-Expression verändert. Da die HDAC5 an die HDAC3 im Zellkern bindet [77] und HDAC3 die Enzymaktivität der HDAC5 ermöglicht [241, 242], könnte HDAC3 somit auch die inflammatorische Regulation durch die HDAC5 vermitteln. Diese

Hypothese wird zusätzlich dadurch gestützt, dass HDAC3 durch eine Deacetylierung von p65 die Expression von NFκB-abhängigen Genen induziert [238]. Daher kann ein regulatorischer Signalweg in Makrophagen angenommen werden, bei dem HDAC5 mit HDAC3 interagiert, dadurch NFκB aktiviert und somit zur Produktion der inflammatorischen Zytokine MCP-1 und TNFα führt. Die Relevanz eines derartigen Zusammenspiels der HDAC5 und HDAC3 für chronische Darmentzündungen wird dadurch bestätigt, dass sowohl die Expression der HDAC3 als auch der HDAC5 durch eine DSS-Kolitis im Mausmodell gesteigert wird [107].

Um zu überprüfen, ob die Transkription anderer HDACs ebenfalls durch eine Aktivierung des TLR4-Signalweges in Makrophagen beeinflusst wird, wurde in der vorliegenden Arbeit der Effekt einer LPS-Stimulation auf die mRNA-Expression der einzelnen HDACs untersucht.

Eine Inkubation mit LPS in einer geringen Konzentration von 10 ng/ml moduliert die Expression der HDACs auf mRNA-Ebene in aus dem Knochenmark von Mäusen isolierten Makrophagen: Während die Expression der HDAC1 nach einer Stimulation über vier bis acht Stunden und die Expression der HDAC9 nach zwei bis vier Stunden gesteigert wird, ist die Expression der HDAC4, 6, 7, 8, 10 und 11 nach einer Inkubationsdauer von vier bis sechs Stunden vermindert. Nach 24 Stunden ist die Expression der HDAC4, 7 und 8 deutlich erhöht, die Expression der HDAC6, 10 und 11 hingegen vermindert. Die Expression der HDAC1 und 9 erreicht nach 24 Stunden Inkubation mit LPS wieder das Ausgangsniveau der basalen Expression [195]. Der Einfluss einer Inkubation mit 10 ng/ml LPS auf die Expression der HDAC2 und 3 wurde bisher nicht untersucht. Eine Inkubation mit einer hohen Konzentration von 1 µg/ml LPS führt zu einer veränderten Modulation der mRNA-Expression der HDACs in primären Makrophagen aus dem Knochenmark von Mäusen: Durch eine LPS-Stimulation über sechs Stunden wird die Expression aller HDACs deutlich vermindert. Bei einer Kulturdauer von 24 Stunden in Gegenwart von LPS scheint das Alter der Mäuse einen Effekt auf die Regulation der Expression zu besitzen: Während in Makrophagen aus alten Mäusen die Expression aller HDACs deutlich gesteigert wird, wird in Zellen aus jungen Tieren nur die Expression der HDAC1 und 9 in ähnlicher Weise nach 24 Stunden gesteigert. Alle anderen HDACs erreichen nach dieser Stimulationsdauer wieder etwa das Niveau der basalen Expression [196]. Die unterschiedlichen Effekte durch verschiedene LPS-Konzentrationen

weisen auf eine Dosisabhängigkeit des regulatorischen Effekts in primären Makrophagen der Maus hin. In RAW 264.7-Zellen wird die Expression aller HDACs durch Inkubation mit 100 ng/ml LPS über 18 Stunden deutlich reduziert [180]. Der Effekt einer kurzfristigeren LPS-Stimulation wurde bisher in RAW 264.7-Zellen nicht analysiert. Daher wurde die mRNA-Expression der HDAC-Subtypen nach bis zu sieben Stunden Kultur in Gegenwart von LPS untersucht.

Die Expression der HDAC1, 2 und 3 wurde in RAW 264.7-Zellen durch eine Stimulation bis zu drei Stunden deutlich erhöht, bevor sie nach sieben Stunden Kultur wieder das Niveau der Basisexpression erreichte. Die Expression der HDACs 4 bis 11 wurde im Gegensatz dazu durch eine Inkubation mit LPS bis zu sieben Stunden deutlich vermindert (Abb. 17). Die Analyse der Expressionsveränderungen deutete somit auf eine gleichartige Regulation der HDACs einer Klasse hin. So wurde die Expression der HDACs der Klasse I abgesehen von der HDAC8 gesteigert, die Expression der HDACs der Klasse II und IV hingegen durch die Inkubation mit LPS vermindert. Dies könnte auf eine mögliche funktionelle Gemeinsamkeit der HDACs einer phylogenetischen Gruppe in der Immunantwort von Makrophagen hinweisen. Darüber hinaus zeigte die Regulation der HDACs in den RAW 264.7-Zellen große Ähnlichkeiten zu der Modulation in den primären Makrophagen aus dem Knochenmark von Mäusen, da insbesondere die Expression der HDACs der Klasse II und IV in gleicher Weise durch die Stimulation mit LPS reduziert wurde. Dies unterstreicht nochmals die Übertragbarkeit von funktionellen Zusammenhängen in der Makrophagenzelllinie auf primäre Zellen. Die interkurrente Steigerung der HDAC3-Expression durch eine Inkubation mit LPS bekräftigte die zuvor aufgestellte Hypothese einer möglichen Interaktion der HDAC5 und 3. Da eine kurzfristige Inkubation mit LPS zu einer deutlichen Steigerung der HDAC5-Expression führte und eine erhöhte Expression der HDAC5 wiederum in einer Erhöhung der HDAC3-Expression resultierte, könnte der Effekt der LPS-Stimulation auf die Expression der HDAC3 durch die HDAC5 vermittelt werden. Insbesondere der Verlauf der beiden Kinetiken mit einer Hochregulation der HDAC5-Expression nach bis zu 20 min, die die etwas spätere vermehrte Expression der HDAC3 nach ein bis drei Stunden Kultur induzieren könnte, gefolgt von der Verminderung der HDAC5-Expression nach einer längeren LPS-Stimulation über drei bis sieben Stunden, die wiederum die Reduktion der HDAC3-Expression nach sieben Stunden auf das Basisniveau

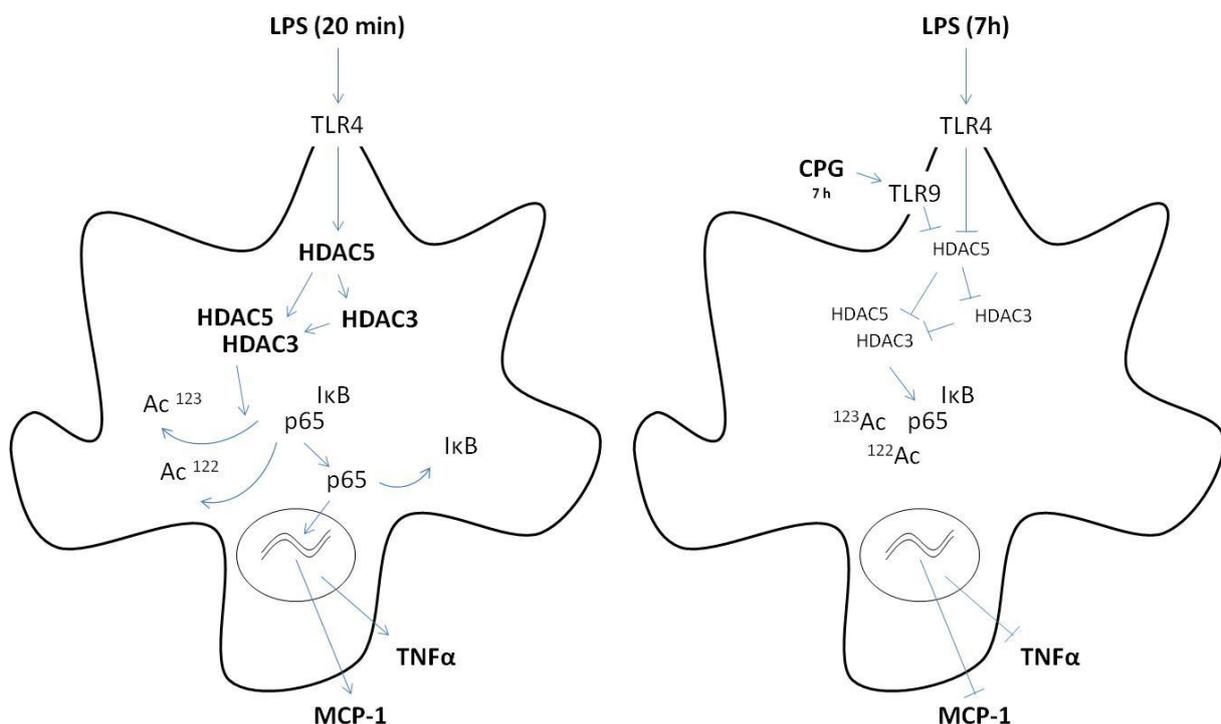
bewirken könnte, unterstützt die Hypothese, dass HDAC5 einen direkten Einfluss auf die Expression der HDAC3 nimmt und dieser Regulationsmechanismus eine wichtige Funktion in der Immunantwort von Makrophagen besitzt.

## **6 Schlussfolgerung und Ausblick**

HDAC-Inhibitoren hemmen in murinen und humanen Makrophagen die Sekretion von TNF $\alpha$  [91, 219, 245]. In humanen PBMCs wird dieser Effekt durch den NF $\kappa$ B-Signalweg vermittelt [245]. Dies weist auf eine pro-inflammatorische Funktion der HDACs in Makrophagen durch Aktivierung des NF $\kappa$ B-Signalweges hin. Welche Funktion die einzelnen HDACs in der Immunantwort von Makrophagen besitzen, war bisher jedoch weitgehend unbekannt.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass in murinen RAW 264.7-Zellen die Expression der HDAC5 durch inflammatorische Zytokine und CpG-Oligonukleotide reguliert wird. Dabei bewirkte eine kurzfristige LPS-Stimulation bis zu 20 min eine Steigerung der HDAC5-Expression. Darüber hinaus konnte erstmals nachgewiesen werden, dass die HDAC5-Expression die Produktion von pro-inflammatorischen Faktoren in diesen Zellen reguliert, da eine Modulation der HDAC5-Expression zu einer parallelen Veränderung der Konzentration von TNF $\alpha$  und MCP-1 führte. Dies weist auf einen pro-inflammatorischen Effekt der HDAC5 in den RAW 264.7-Zellen hin, indem LPS die Expression der HDAC5 induziert und dadurch die Produktion pro-inflammatorischer Faktoren stimuliert. Als möglicher Mediator dieser Funktion der HDAC5 wurde der NF $\kappa$ B-Signalweg identifiziert, weil eine Steigerung der HDAC5-Expression mit einer vermehrten Aktivität von NF $\kappa$ B einherging. Da HDAC5 mit HDAC3 interagiert und HDAC3 die HDAC-Aktivität der HDAC5 vermittelt [241, 242], wurde zudem untersucht, in welcher Weise eine veränderte HDAC5-Expression die Expression der anderen HDAC-Subtypen beeinflusst. Dabei zeigte sich die Expression der HDAC3 parallel zu der der HDAC5 moduliert. Da HDAC3 durch Deacetylierung der Lysinseitenketten 122 und 123 von p65 die Abspaltung von I $\kappa$ B und dadurch den Eintritt von p65 in den Zellkern ermöglicht [238], erscheint eine Interaktion der HDAC5 mit HDAC3 zur Aktivierung von NF $\kappa$ B plausibel. Diese Hypothese wird zudem durch eine Analyse der Expression der HDAC-Subtypen nach LPS-Stimulation unterstützt, da eine

Inkubation der RAW 264.7-Zellen über ein bis drei Stunden zu einer Steigerung der Expression der HDAC3 führte. Die Verminderung der HDAC5-Expression in RAW 264.7-Zellen durch eine längere LPS-Stimulation über 7 Stunden deutet auf einen möglichen Rückkopplungsmechanismus hin, der eine überschießende pro-inflammatorische Immunantwort verhindern soll. Einen ähnlichen Zweck könnte auch die vermehrte Produktion von IL-10 durch die gesteigerte HDAC5-Expression haben. Da eine verminderte Expression der HDAC5 auch in den humanen U937-Zellen zu einer Reduktion der TNF $\alpha$ -Produktion führte, erscheinen die im murinen System gesammelten Erkenntnisse auf humane Makrophagen übertragbar. Die Abbildung 22 illustriert schematisch die Vorstellung, wie die unterschiedlichen Kurz- und Langzeitwirkungen von LPS und CpG-Oligonukleotiden über die Interaktion der HDAC5 vermittelt werden. Die HDAC5 verstärkt in Makrophagen die durch TLR4-Stimulation induzierte Produktion pro-inflammatorischer Faktoren, indem sie durch Interaktion mit HDAC3 den NF $\kappa$ B-Signalweg aktiviert.



**Abb. 22: HDAC5 reguliert die inflammatorische Immunantwort von Makrophagen.** Eine kurzfristige Stimulation von Makrophagen mit LPS steigert die Expression der HDAC5. Die vermehrte HDAC5-Expression bewirkt wiederum eine Steigerung der HDAC3-Expression. Die vermehrt exprimierte HDAC3 interagiert mit HDAC5 und vermittelt deren HDAC-Aktivität. Dies führt zu einer Deacetylierung von

p65 an den Lysinseitenketten 122 und 123. Dadurch wird I $\kappa$ B von p65 abgespalten und p65 kann in den Zellkern translozieren. Dies resultiert in einer vermehrten Expression NF $\kappa$ B-abhängiger Gene, wie z.B. TNF und MCP-1. Eine längerfristige Stimulation mit LPS oder CpG-Oligonukleotiden inhibiert die Expression der HDAC5. Dies resultiert wiederum in einer verminderten HDAC3-Expression. Die verminderte HDAC-Aktivität der HDAC5 und 3 bewirkt eine vermehrte Acetylierung von p65, welches dadurch im Zytoplasma verbleibt. Hierdurch wird die Expression NF $\kappa$ B-abhängiger Gene wie TNF $\alpha$  und MCP-1 inhibiert (eigene Daten, [77, 231, 232, 238, 241, 242, 245]).

Um die *in vitro* erkannten Wirkungen und Regulationsmechanismen auch *in vivo* zu bestätigen, sind Untersuchungen an HDAC5-*knockout*-Mäusen erforderlich. Dabei sollte vor allem der Frage nachgegangen werden, wie die Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen in Makrophagen aus den *knockout*-Tieren im Vergleich zu Wildtypen verändert ist und welchen Effekt die fehlende HDAC5-Expression in den Mäusen auf den Verlauf einer experimentellen Kolitis besitzt.

Die klinische Relevanz der immunregulatorischen Funktion der HDAC5 besteht in der möglichen Entwicklung eines selektiven HDAC-Inhibitors zur Therapie der CED. So wäre die Entwicklung eines spezifischen HDAC5-Inhibitors oder aber eines Inhibitors des Komplexes aus HDAC5 und HDAC3 denkbar. Dies könnte die pro-inflammatorische Polarisierung der Makrophagen beschränken und somit die Dysregulation des Immunsystems inhibieren. Für die bisherigen Pan-HDAC-Inhibitoren konnte zwar ein therapeutischer Effekt in verschiedenen Mausmodellen zur CED nachgewiesen werden [93], jedoch besitzen diese Wirkstoffe eventuell aufgrund ihrer mangelnden Spezifität unerwünschte Nebenwirkungen wie Übelkeit, Erbrechen, Diarrhoe, Leberwerterhöhungen, Leukopenie, Thrombopenie, EKG-Veränderungen wie z.B. eine Verlängerung der QT-Zeit, Dyspnoe und neuropsychologische Auffälligkeiten [246]. Sollte der pro-inflammatorische Effekt der HDAC5 daher auch *in vivo* vorhanden und entscheidend an der Aufrechterhaltung der dysregulierten Immunreaktion beteiligt sein, könnte eine spezifische Inhibition dieser HDAC eine nebenwirkungsärmere Therapie ermöglichen.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Wallace, K.L., et al., *Immunopathology of inflammatory bowel disease*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(1): p. 6-21.
2. Molodecky, N.A., et al., *Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review*. Gastroenterology, 2012. **142**(1): p. 46-54 e42.
3. Steinbach, E.C. and S.E. Plevy, *The role of macrophages and dendritic cells in the initiation of inflammation in IBD*. Inflamm Bowel Dis, 2014. **20**(1): p. 166-75.
4. Maloy, K.J. and F. Powrie, *Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease*. Nature, 2011. **474**(7351): p. 298-306.
5. Leone, V.A., C.M. Cham, and E.B. Chang, *Diet, gut microbes, and genetics in immune function: can we leverage our current knowledge to achieve better outcomes in inflammatory bowel diseases?* Curr Opin Immunol, 2014. **31**: p. 16-23.
6. Mathew, C.G., *New links to the pathogenesis of Crohn disease provided by genome-wide association scans*. Nat Rev Genet, 2008. **9**(1): p. 9-14.
7. Hugot, J.P., et al., *Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease*. Nature, 2001. **411**(6837): p. 599-603.
8. Strober, W., et al., *The molecular basis of NOD2 susceptibility mutations in Crohn's disease*. Mucosal Immunol, 2008. **1 Suppl 1**: p. S5-9.
9. Virgin, H.W. and J.A. Todd, *Metagenomics and personalized medicine*. Cell, 2011. **147**(1): p. 44-56.
10. Kumar, H., T. Kawai, and S. Akira, *Pathogen recognition in the innate immune response*. Biochem J, 2009. **420**(1): p. 1-16.
11. Mowat, A.M. and C.C. Bain, *Mucosal macrophages in intestinal homeostasis and inflammation*. J Innate Immun, 2011. **3**(6): p. 550-64.
12. Martinez, F.O., et al., *Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression*. J Immunol, 2006. **177**(10): p. 7303-11.
13. Murray, P.J. and T.A. Wynn, *Protective and pathogenic functions of macrophage subsets*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(11): p. 723-37.
14. Arnold, L., et al., *Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis*. J Exp Med, 2007. **204**(5): p. 1057-69.
15. Biswas, S.K. and A. Mantovani, *Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm*. Nat Immunol, 2010. **11**(10): p. 889-96.
16. Lee, S.H., P.M. Starkey, and S. Gordon, *Quantitative analysis of total macrophage content in adult mouse tissues. Immunochemical studies with monoclonal antibody F4/80*. J Exp Med, 1985. **161**(3): p. 475-89.
17. Smythies, L.E., et al., *Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity*. J Clin Invest, 2005. **115**(1): p. 66-75.
18. Weber, B., L. Saurer, and C. Mueller, *Intestinal macrophages: differentiation and involvement in intestinal immunopathologies*. Semin Immunopathol, 2009. **31**(2): p. 171-84.
19. Agarwal, S. and L. Mayer, *Gastrointestinal manifestations in primary immune disorders*. Inflamm Bowel Dis, 2010. **16**(4): p. 703-11.

20. Qualls, J.E., et al., *Suppression of experimental colitis by intestinal mononuclear phagocytes*. J Leukoc Biol, 2006. **80**(4): p. 802-15.
21. Lin, H.H., et al., *The macrophage F4/80 receptor is required for the induction of antigen-specific efferent regulatory T cells in peripheral tolerance*. J Exp Med, 2005. **201**(10): p. 1615-25.
22. Denning, T.L., et al., *Lamina propria macrophages and dendritic cells differentially induce regulatory and interleukin 17-producing T cell responses*. Nat Immunol, 2007. **8**(10): p. 1086-94.
23. Smythies, L.E., et al., *Inflammation anergy in human intestinal macrophages is due to Smad-induced IkappaBalpha expression and NF-kappaB inactivation*. J Biol Chem, 2010. **285**(25): p. 19593-604.
24. Hadis, U., et al., *Intestinal tolerance requires gut homing and expansion of FoxP3+ regulatory T cells in the lamina propria*. Immunity, 2011. **34**(2): p. 237-46.
25. Smith, P.D., et al., *Intestinal macrophages and response to microbial encroachment*. Mucosal Immunol, 2011. **4**(1): p. 31-42.
26. Pull, S.L., et al., *Activated macrophages are an adaptive element of the colonic epithelial progenitor niche necessary for regenerative responses to injury*. Proc Natl Acad Sci USA, 2005. **102**(1): p. 99-104.
27. Hunter, M.M., et al., *In vitro-derived alternatively activated macrophages reduce colonic inflammation in mice*. Gastroenterology, 2010. **138**(4): p. 1395-405.
28. Kamada, N., et al., *Unique CD14 intestinal macrophages contribute to the pathogenesis of Crohn disease via IL-23/IFN-gamma axis*. J Clin Invest, 2008. **118**(6): p. 2269-80.
29. Jiang, Q., et al., *Lipopolysaccharide induces physical proximity between CD14 and toll-like receptor 4 (TLR4) prior to nuclear translocation of NF-kappa B*. J Immunol, 2000. **165**(7): p. 3541-4.
30. Watanabe, N., et al., *Elimination of local macrophages in intestine prevents chronic colitis in interleukin-10-deficient mice*. Dig Dis Sci, 2003. **48**(2): p. 408-14.
31. Varol, C., et al., *Intestinal lamina propria dendritic cell subsets have different origin and functions*. Immunity, 2009. **31**(3): p. 502-12.
32. Ma, T.Y., et al., *TNF-alpha-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability requires NF-kappa B activation*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2004. **286**(3): p. G367-76.
33. Gomez-Llorente, C., S. Munoz, and A. Gil, *Role of Toll-like receptors in the development of immunotolerance mediated by probiotics*. Proc Nutr Soc, 2010. **69**(3): p. 381-9.
34. Rehli, M., et al., *PU.1 and interferon consensus sequence-binding protein regulate the myeloid expression of the human Toll-like receptor 4 gene*. J Biol Chem, 2000. **275**(13): p. 9773-81.
35. Gronbach, K., et al., *Endotoxicity of lipopolysaccharide as a determinant of T-cell-mediated colitis induction in mice*. Gastroenterology, 2014. **146**(3): p. 765-75.
36. Platt, A.M. and A.M. Mowat, *Mucosal macrophages and the regulation of immune responses in the intestine*. Immunol Lett, 2008. **119**(1-2): p. 22-31.
37. Slack, E., et al., *Innate and adaptive immunity cooperate flexibly to maintain host-microbiota mutualism*. Science, 2009. **325**(5940): p. 617-20.

38. Su, L., et al., *Targeted epithelial tight junction dysfunction causes immune activation and contributes to development of experimental colitis*. Gastroenterology, 2009. **136**(2): p. 551-63.
39. Uno, J.K., et al., *Altered macrophage function contributes to colitis in mice defective in the phosphoinositide-3 kinase subunit p110delta*. Gastroenterology, 2010. **139**(5): p. 1642-53, 1653 e1-6.
40. Munitz, A., et al., *Paired immunoglobulin-like receptor B (PIR-B) negatively regulates macrophage activation in experimental colitis*. Gastroenterology, 2010. **139**(2): p. 530-41.
41. Rakoff-Nahoum, S., L. Hao, and R. Medzhitov, *Role of toll-like receptors in spontaneous commensal-dependent colitis*. Immunity, 2006. **25**(2): p. 319-29.
42. Hausmann, M., et al., *Toll-like receptors 2 and 4 are up-regulated during intestinal inflammation*. Gastroenterology, 2002. **122**(7): p. 1987-2000.
43. Franchimont, D., et al., *Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis*. Gut, 2004. **53**(7): p. 987-92.
44. Kobayashi, K.S., et al., *Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract*. Science, 2005. **307**(5710): p. 731-4.
45. Vaishnava, S., et al., *Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface*. Proc Natl Acad Sci USA, 2008. **105**(52): p. 20858-63.
46. Lee, J.H., et al., *Lactobacillus suntoryeus inhibits pro-inflammatory cytokine expression and TLR-4-linked NF-kappaB activation in experimental colitis*. Int J Colorectal Dis, 2009. **24**(2): p. 231-7.
47. Stout, R.D. and J. Suttles, *Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments*. J Leukoc Biol, 2004. **76**(3): p. 509-13.
48. Kamada, N., et al., *Abnormally differentiated subsets of intestinal macrophage play a key role in Th1-dominant chronic colitis through excess production of IL-12 and IL-23 in response to bacteria*. J Immunol, 2005. **175**(10): p. 6900-8.
49. Takeuchi, O. and S. Akira, *Epigenetic control of macrophage polarization*. Eur J Immunol, 2011. **41**(9): p. 2490-3.
50. Gordon, S., *Alternative activation of macrophages*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(1): p. 23-35.
51. Fleetwood, A.J., et al., *GM-CSF- and M-CSF-dependent macrophage phenotypes display differential dependence on type I interferon signaling*. J Leukoc Biol, 2009. **86**(2): p. 411-21.
52. Fleetwood, A.J., et al., *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF) and macrophage CSF-dependent macrophage phenotypes display differences in cytokine profiles and transcription factor activities: implications for CSF blockade in inflammation*. J Immunol, 2007. **178**(8): p. 5245-52.
53. Mantovani, A., et al., *Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes*. Trends Immunol, 2002. **23**(11): p. 549-55.
54. Verreck, F.A., et al., *Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria*. Proc Natl Acad Sci USA, 2004. **101**(13): p. 4560-5.
55. Takeuchi, O. and S. Akira, *Pattern recognition receptors and inflammation*. Cell, 2010. **140**(6): p. 805-20.

56. Medzhitov, R. and T. Horng, *Transcriptional control of the inflammatory response*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(10): p. 692-703.
57. Charo, I.F., *Macrophage polarization and insulin resistance: PPARgamma in control*. Cell Metab, 2007. **6**(2): p. 96-8.
58. Ji, H., et al., *Comprehensive methylome map of lineage commitment from haematopoietic progenitors*. Nature, 2010. **467**(7313): p. 338-42.
59. Satoh, T., et al., *The Jmjd3-Irf4 axis regulates M2 macrophage polarization and host responses against helminth infection*. Nat Immunol, 2010. **11**(10): p. 936-44.
60. Mullican, S.E., et al., *Histone deacetylase 3 is an epigenomic brake in macrophage alternative activation*. Genes Dev, 2011. **25**(23): p. 2480-8.
61. Chen, X., et al., *Requirement for the histone deacetylase Hdac3 for the inflammatory gene expression program in macrophages*. Proc Natl Acad Sci USA, 2012. **109**(42): p. E2865-74.
62. Kobayashi, T., et al., *IL-10 regulates Il12b expression via histone deacetylation: implications for intestinal macrophage homeostasis*. J Immunol, 2012. **189**(4): p. 1792-9.
63. Crabbe, P.A., et al., *Immunohistochemical observations on lymphoid tissues from conventional and germ-free mice*. Lab Invest, 1970. **22**(5): p. 448-57.
64. Guy-Grand, D., et al., *Two gut intraepithelial CD8+ lymphocyte populations with different T cell receptors: a role for the gut epithelium in T cell differentiation*. J Exp Med, 1991. **173**(2): p. 471-81.
65. Vatn, M.H. and A.K. Sandvik, *Inflammatory bowel disease*. Scand J Gastroenterol, 2015. **50**(6): p. 748-62.
66. Kau, A.L., et al., *Human nutrition, the gut microbiome and the immune system*. Nature, 2011. **474**(7351): p. 327-36.
67. Frank, D.N., et al., *Disease phenotype and genotype are associated with shifts in intestinal-associated microbiota in inflammatory bowel diseases*. Inflamm Bowel Dis, 2011. **17**(1): p. 179-84.
68. Wade, P.A., *Transcriptional control at regulatory checkpoints by histone deacetylases: molecular connections between cancer and chromatin*. Hum Mol Genet, 2001. **10**(7): p. 693-8.
69. Spange, S., et al., *Acetylation of non-histone proteins modulates cellular signalling at multiple levels*. Int J Biochem Cell Biol, 2009. **41**(1): p. 185-98.
70. de Ruijter, A.J., et al., *Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family*. Biochem J, 2003. **370**(Pt 3): p. 737-49.
71. Haberland, M., R.L. Montgomery, and E.N. Olson, *The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy*. Nat Rev Genet, 2009. **10**(1): p. 32-42.
72. Inoue, A. and D. Fujimoto, *Enzymatic deacetylation of histone*. Biochem Biophys Res Commun, 1969. **36**(1): p. 146-50.
73. Rundlett, S.E., et al., *Transcriptional repression by UME6 involves deacetylation of lysine 5 of histone H4 by RPD3*. Nature, 1998. **392**(6678): p. 831-5.
74. Wang, Z., et al., *Genome-wide mapping of HATs and HDACs reveals distinct functions in active and inactive genes*. Cell, 2009. **138**(5): p. 1019-31.
75. Mihaylova, M.M. and R.J. Shaw, *Metabolic reprogramming by class I and II histone deacetylases*. Trends Endocrinol Metab, 2013. **24**(1): p. 48-57.
76. Taunton, J., C.A. Hassig, and S.L. Schreiber, *A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p*. Science, 1996. **272**(5260): p. 408-11.

77. Grozinger, C.M., C.A. Hassig, and S.L. Schreiber, *Three proteins define a class of human histone deacetylases related to yeast Hda1p*. Proc Natl Acad Sci USA, 1999. **96**(9): p. 4868-73.
78. Gao, L., et al., *Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family*. J Biol Chem, 2002. **277**(28): p. 25748-55.
79. Zhou, X., et al., *Cloning and characterization of a histone deacetylase, HDAC9*. Proc Natl Acad Sci USA, 2001. **98**(19): p. 10572-7.
80. Fischer, D.D., et al., *Isolation and characterization of a novel class II histone deacetylase, HDAC10*. J Biol Chem, 2002. **277**(8): p. 6656-66.
81. Grozinger, C.M. and S.L. Schreiber, *Regulation of histone deacetylase 4 and 5 and transcriptional activity by 14-3-3-dependent cellular localization*. Proc Natl Acad Sci USA, 2000. **97**(14): p. 7835-40.
82. McGee, S.L., et al., *AMP-activated protein kinase regulates GLUT4 transcription by phosphorylating histone deacetylase 5*. Diabetes, 2008. **57**(4): p. 860-7.
83. Vega, R.B., et al., *Protein kinases C and D mediate agonist-dependent cardiac hypertrophy through nuclear export of histone deacetylase 5*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(19): p. 8374-85.
84. McKinsey, T.A., C.L. Zhang, and E.N. Olson, *Activation of the myocyte enhancer factor-2 transcription factor by calcium/calmodulin-dependent protein kinase-stimulated binding of 14-3-3 to histone deacetylase 5*. Proc Natl Acad Sci USA, 2000. **97**(26): p. 14400-5.
85. Icardi, L., K. De Bosscher, and J. Tavernier, *The HAT/HDAC interplay: multilevel control of STAT signaling*. Cytokine Growth Factor Rev, 2012. **23**(6): p. 283-91.
86. Nusinzon, I. and C.M. Horvath, *Interferon-stimulated transcription and innate antiviral immunity require deacetylase activity and histone deacetylase 1*. Proc Natl Acad Sci USA, 2003. **100**(25): p. 14742-7.
87. Rossig, L., et al., *Inhibitors of histone deacetylation downregulate the expression of endothelial nitric oxide synthase and compromise endothelial cell function in vasorelaxation and angiogenesis*. Circ Res, 2002. **91**(9): p. 837-44.
88. Zhou, Q., et al., *Inhibition of histone deacetylases promotes ubiquitin-dependent proteasomal degradation of DNA methyltransferase 1 in human breast cancer cells*. Mol Cancer Res, 2008. **6**(5): p. 873-83.
89. Januchowski, R., et al., *Trichostatin A down-regulate DNA methyltransferase 1 in Jurkat T cells*. Cancer Lett, 2007. **246**(1-2): p. 313-7.
90. Shakespear, M.R., et al., *Histone deacetylases as regulators of inflammation and immunity*. Trends Immunol, 2011. **32**(7): p. 335-43.
91. Leoni, F., et al., *The antitumor histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid exhibits antiinflammatory properties via suppression of cytokines*. Proc Natl Acad Sci USA, 2002. **99**(5): p. 2995-3000.
92. Nishida, K., et al., *Histone deacetylase inhibitor suppression of autoantibody-mediated arthritis in mice via regulation of p16INK4a and p21(WAF1/Cip1) expression*. Arthritis Rheum, 2004. **50**(10): p. 3365-76.
93. Glauben, R. and B. Siegmund, *Inhibition of histone deacetylases in inflammatory bowel diseases*. Mol Med, 2011. **17**(5-6): p. 426-33.
94. Vojinovic, J., et al., *Safety and efficacy of an oral histone deacetylase inhibitor in systemic-onset juvenile idiopathic arthritis*. Arthritis Rheum, 2011. **63**(5): p. 1452-8.

95. Cantley, M.D. and D.R. Haynes, *Epigenetic regulation of inflammation: progressing from broad acting histone deacetylase (HDAC) inhibitors to targeting specific HDACs*. *Inflammopharmacology*, 2013. **21**(4): p. 301-7.
96. Kawabata, T., et al., *Increased activity and expression of histone deacetylase 1 in relation to tumor necrosis factor-alpha in synovial tissue of rheumatoid arthritis*. *Arthritis Res Ther*, 2010. **12**(4): p. R133.
97. Zhang, Z.Y. and H.J. Schluessener, *HDAC inhibitor MS-275 attenuates the inflammatory reaction in rat experimental autoimmune prostatitis*. *Prostate*, 2012. **72**(1): p. 90-9.
98. Lin, H.S., et al., *Anti-rheumatic activities of histone deacetylase (HDAC) inhibitors in vivo in collagen-induced arthritis in rodents*. *Br J Pharmacol*, 2007. **150**(7): p. 862-72.
99. Zhang, Z.Y., Z. Zhang, and H.J. Schluessener, *MS-275, an histone deacetylase inhibitor, reduces the inflammatory reaction in rat experimental autoimmune neuritis*. *Neuroscience*, 2010. **169**(1): p. 370-7.
100. Janzer, A., et al., *Lysine-specific demethylase 1 (LSD1) and histone deacetylase 1 (HDAC1) synergistically repress proinflammatory cytokines and classical complement pathway components*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012. **421**(4): p. 665-70.
101. Vashisht Gopal, Y.N., T.S. Arora, and M.W. Van Dyke, *Tumour necrosis factor-alpha depletes histone deacetylase 1 protein through IKK2*. *EMBO Rep*, 2006. **7**(3): p. 291-6.
102. Grausenburger, R., et al., *Conditional deletion of histone deacetylase 1 in T cells leads to enhanced airway inflammation and increased Th2 cytokine production*. *J Immunol*, 2010. **185**(6): p. 3489-97.
103. Ito, K., et al., *Expression and activity of histone deacetylases in human asthmatic airways*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002. **166**(3): p. 392-6.
104. Barnes, P.J., *Role of HDAC2 in the pathophysiology of COPD*. *Annu Rev Physiol*, 2009. **71**: p. 451-64.
105. Barnes, P.J., *Histone deacetylase-2 and airway disease*. *Ther Adv Respir Dis*, 2009. **3**(5): p. 235-43.
106. Turgeon, N., et al., *The acetylome regulators Hdac1 and Hdac2 differently modulate intestinal epithelial cell dependent homeostatic responses in experimental colitis*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2014. **306**(7): p. G594-605.
107. de Zoeten, E.F., et al., *Inhibition of HDAC9 increases T regulatory cell function and prevents colitis in mice*. *Gastroenterology*, 2010. **138**(2): p. 583-94.
108. Gillespie, J., et al., *Histone deacetylases are dysregulated in rheumatoid arthritis and a novel histone deacetylase 3-selective inhibitor reduces interleukin-6 production by peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients*. *Arthritis Rheum*, 2012. **64**(2): p. 418-22.
109. Kim, Y., et al., *Histone deacetylase 3 mediates allergic skin inflammation by regulating expression of MCP1 protein*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(31): p. 25844-59.
110. Winkler, A.R., K.N. Nocka, and C.M. Williams, *Smoke exposure of human macrophages reduces HDAC3 activity, resulting in enhanced inflammatory cytokine production*. *Pulm Pharmacol Ther*, 2012. **25**(4): p. 286-92.
111. Han, S., et al., *Recruitment of histone deacetylase 4 by transcription factors represses interleukin-5 transcription*. *Biochem J*, 2006. **400**(3): p. 439-48.

112. Luan, B., et al., *Leptin-mediated increases in catecholamine signaling reduce adipose tissue inflammation via activation of macrophage HDAC4*. Cell Metab, 2014. **19**(6): p. 1058-65.
113. Cao, K., et al., *Decreased histone deacetylase 4 is associated with human osteoarthritis cartilage degeneration by releasing histone deacetylase 4 inhibition of runt-related transcription factor-2 and increasing osteoarthritis-related genes: a novel mechanism of human osteoarthritis cartilage degeneration*. Arthritis Res Ther, 2014. **16**(6): p. 491.
114. Usui, T., et al., *HDAC4 mediates development of hypertension via vascular inflammation in spontaneous hypertensive rats*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2012. **302**(9): p. H1894-904.
115. Qian, D.Z., et al., *Class II histone deacetylases are associated with VHL-independent regulation of hypoxia-inducible factor 1 alpha*. Cancer Res, 2006. **66**(17): p. 8814-21.
116. Wang, B., et al., *Glycolysis-dependent histone deacetylase 4 degradation regulates inflammatory cytokine production*. Mol Biol Cell, 2014. **25**(21): p. 3300-7.
117. Yu, Z., W. Zhang, and B.C. Kone, *Histone deacetylases augment cytokine induction of the iNOS gene*. J Am Soc Nephrol, 2002. **13**(8): p. 2009-17.
118. Baek, Y.S., et al., *Identification of novel transcriptional regulators involved in macrophage differentiation and activation in U937 cells*. BMC Immunol, 2009. **10**: p. 18.
119. Miao, F., et al., *In vivo chromatin remodeling events leading to inflammatory gene transcription under diabetic conditions*. J Biol Chem, 2004. **279**(17): p. 18091-7.
120. Schmeck, B., et al., *Histone acetylation and flagellin are essential for Legionella pneumophila-induced cytokine expression*. J Immunol, 2008. **181**(2): p. 940-7.
121. Ito, K., et al., *Decreased histone deacetylase activity in chronic obstructive pulmonary disease*. N Engl J Med, 2005. **352**(19): p. 1967-76.
122. Qu, Y., et al., *Expression level of histone deacetylase 2 correlates with occurring of chronic obstructive pulmonary diseases*. Mol Biol Rep, 2012.
123. Beurel, E., *HDAC6 regulates LPS-tolerance in astrocytes*. PLoS One, 2011. **6**(10): p. e25804.
124. Vishwakarma, S., et al., *Tubastatin, a selective histone deacetylase 6 inhibitor shows anti-inflammatory and anti-rheumatic effects*. Int Immunopharmacol, 2013. **16**(1): p. 72-8.
125. Tsuji, G., et al., *Histone deacetylase 6 inhibition impairs effector CD8 T-cell functions during skin inflammation*. J Allergy Clin Immunol, 2014.
126. de Zoeten, E.F., et al., *Histone deacetylase 6 and heat shock protein 90 control the functions of Foxp3(+) T-regulatory cells*. Mol Cell Biol, 2011. **31**(10): p. 2066-78.
127. Halili, M.A., et al., *Differential effects of selective HDAC inhibitors on macrophage inflammatory responses to the Toll-like receptor 4 agonist LPS*. J Leukoc Biol, 2010. **87**(6): p. 1103-14.
128. Kato, H., S. Tamamizu-Kato, and F. Shibasaki, *Histone deacetylase 7 associates with hypoxia-inducible factor 1alpha and increases transcriptional activity*. J Biol Chem, 2004. **279**(40): p. 41966-74.
129. Soliman, M.L., et al., *Acetate supplementation modulates brain histone acetylation and decreases interleukin-1beta expression in a rat model of neuroinflammation*. J Neuroinflammation, 2012. **9**: p. 51.

130. Higashiyama, R., et al., *Correlation between MMP-13 and HDAC7 expression in human knee osteoarthritis*. Mod Rheumatol, 2010. **20**(1): p. 11-7.
131. Li, S., et al., *Specific inhibition of histone deacetylase 8 reduces gene expression and production of proinflammatory cytokines in vitro and in vivo*. J Biol Chem, 2014.
132. Yan, K., et al., *Histone deacetylase 9 deficiency protects against effector T cell-mediated systemic autoimmunity*. J Biol Chem, 2011. **286**(33): p. 28833-43.
133. Cao, Q., et al., *Histone deacetylase 9 represses cholesterol efflux and alternatively activated macrophages in atherosclerosis development*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2014. **34**(9): p. 1871-9.
134. Hou, X., et al., *Histone deacetylase inhibitor regulates the balance of Th17/Treg in allergic asthma*. Clin Respir J, 2014.
135. Choi, J.S., et al., *Array CGH reveals genomic aberrations in human emphysema*. Lung, 2009. **187**(3): p. 165-72.
136. Villagra, A., et al., *The histone deacetylase HDAC11 regulates the expression of interleukin 10 and immune tolerance*. Nat Immunol, 2009. **10**(1): p. 92-100.
137. Glaubien, R., et al., *Histone deacetylase inhibitors modulate interleukin 6-dependent CD4+ T cell polarization in vitro and in vivo*. J Biol Chem, 2014. **289**(9): p. 6142-51.
138. Sonnenberg, E., Glaubien, R., Siegmund, B., unpublished
139. Grabiec, A.M., et al., *Histone deacetylase inhibitors suppress inflammatory activation of rheumatoid arthritis patient synovial macrophages and tissue*. J Immunol, 2010. **184**(5): p. 2718-28.
140. Wetzell, M., Glaubien, R., Siegmund, B., unpublished
141. Raschke, W.C., et al., *Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus*. Cell, 1978. **15**(1): p. 261-7.
142. Sundstrom, C. and K. Nilsson, *Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937)*. Int J Cancer, 1976. **17**(5): p. 565-77.
143. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci USA, 1977. **74**(12): p. 5463-7.
144. Hanahan, D., *Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids*. J Mol Biol, 1983. **166**(4): p. 557-80.
145. Cohen, S.N. and A.C. Chang, *A method for selective cloning of eukaryotic DNA fragments in Escherichia coli by repeated transformation*. Mol Gen Genet, 1974. **134**(2): p. 133-41.
146. Mühlhardt, C., *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. 6. Aufl. Spektrum akademischer Verlag der Wissenschaft, 2009. p. 42-165
147. Birnboim, H.C. and J. Doly, *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*. Nucleic Acids Res, 1979. **7**(6): p. 1513-23.
148. Nathans, D. and H.O. Smith, *Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of dna molecules*. Annu Rev Biochem, 1975. **44**: p. 273-93.
149. Helling, R.B., H.M. Goodman, and H.W. Boyer, *Analysis of endonuclease R-EcoRI fragments of DNA from lambdaoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis*. J Virol, 1974. **14**(5): p. 1235-44.
150. Vogelstein, B. and D. Gillespie, *Preparative and analytical purification of DNA from agarose*. Proc Natl Acad Sci USA, 1979. **76**(2): p. 615-9.
151. Goldmann, E.E., *Vitalfärbung am Zentralnervensystem*. Abh. Preuss. Akd. Wiss. Phys.-Math., 1913. Kl. I (1): p. 1-13.

152. Schnedl, W., *Sex chromatin and nuclear size during cell cycle. Combined histophotometric and autoradiographic studies on human fibroblast cultures.* Chromosoma, 1969. **27**(4): p. 421-35.
153. Stroh, T., et al., *Combined pulse electroporation--a novel strategy for highly efficient transfection of human and mouse cells.* PLoS One, 2010. **5**(3): p. e9488.
154. Nuyts, S., et al., *Efficient isolation of total RNA from Clostridium without DNA contamination.* J Microbiol Methods, 2001. **44**(3): p. 235-8.
155. Dina, D., I. Meza, and M. Crippa, *Relative positions of the "repetitive", "unique" and poly(A) fragments of mRNA.* Nature, 1974. **248**(448): p. 486-90.
156. Chelly, J., et al., *Transcription of the dystrophin gene in human muscle and non-muscle tissue.* Nature, 1988. **333**(6176): p. 858-60.
157. Saiki, R.K., et al., *Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.* 1985. Biotechnology, 1992. **24**: p. 476-80.
158. Mullis, K., et al., *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction.* Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1986. **51 Pt 1**: p. 263-73.
159. Sasaki, T., M. Shintani, and K. Kihara, *Inhibition of growth of mammalian cell cultures by extracts of arginine-utilizing mycoplasmas.* In Vitro, 1984. **20**(5): p. 369-75.
160. You, X.X., Y.H. Zeng, and Y.M. Wu, *Interactions between mycoplasma lipid-associated membrane proteins and the host cells.* J Zhejiang Univ Sci B, 2006. **7**(5): p. 342-50.
161. Rappolee, D.A., et al., *Novel method for studying mRNA phenotypes in single or small numbers of cells.* J Cell Biochem, 1989. **39**(1): p. 1-11.
162. Braman, J., C. Papworth, and A. Greener, *Site-directed mutagenesis using double-stranded plasmid DNA templates.* Methods Mol Biol, 1996. **57**: p. 31-44.
163. Zipper, H., et al., *Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications.* Nucleic Acids Res, 2004. **32**(12): p. e103.
164. Lee, L.G., C.R. Connell, and W. Bloch, *Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes.* Nucleic Acids Res, 1993. **21**(16): p. 3761-6.
165. Winer, J., et al., *Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro.* Anal Biochem, 1999. **270**(1): p. 41-9.
166. Raffael, A. and G. Valet, *Distinction of macrophage subpopulations: measurement of functional cell parameters by flow cytometry.* Adv Exp Med Biol, 1982. **155**: p. 453-9.
167. Castillo, L. and D.M. Maccallum, *Cytokine measurement using cytometric bead arrays.* Methods Mol Biol, 2012. **845**: p. 425-34.
168. Renart, J., J. Reiser, and G.R. Stark, *Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure.* Proc Natl Acad Sci USA, 1979. **76**(7): p. 3116-20.
169. Whitehead, T.P., et al., *Analytical luminescence: its potential in the clinical laboratory.* Clin Chem, 1979. **25**(9): p. 1531-46.
170. Leong, M.M. and G.R. Fox, *Luminescent detection of immunodot and western blots.* Methods Enzymol, 1990. **184**: p. 442-51.

171. Engvall, E. and P. Perlmann, *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G*. *Immunochemistry*, 1971. **8**(9): p. 871-4.
172. Pessara, U. and N. Koch, *Tumor necrosis factor alpha regulates expression of the major histocompatibility complex class II-associated invariant chain by binding of an NF-kappa B-like factor to a promoter element*. *Mol Cell Biol*, 1990. **10**(8): p. 4146-54.
173. Xia, S., et al., *Polycystin-dependent fluid flow sensing targets histone deacetylase 5 to prevent the development of renal cysts*. *Development*, 2010. **137**(7): p. 1075-84.
174. Jones, B.W., et al., *Different Toll-like receptor agonists induce distinct macrophage responses*. *J Leukoc Biol*, 2001. **69**(6): p. 1036-44.
175. Farache, J., et al., *Contributions of dendritic cells and macrophages to intestinal homeostasis and immune defense*. *Immunol Cell Biol*, 2013.
176. Glauben, R., et al., *Histone hyperacetylation is associated with amelioration of experimental colitis in mice*. *J Immunol*, 2006. **176**(8): p. 5015-22.
177. Lemercier, C., et al., *mHDA1/HDAC5 histone deacetylase interacts with and represses MEF2A transcriptional activity*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(20): p. 15594-9.
178. Watamoto, K., et al., *Altered interaction of HDAC5 with GATA-1 during MEL cell differentiation*. *Oncogene*, 2003. **22**(57): p. 9176-84.
179. Lemercier, C., et al., *Class II histone deacetylases are directly recruited by BCL6 transcriptional repressor*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(24): p. 22045-52.
180. Ku, C.S., et al., *Edible blue-green algae reduce the production of pro-inflammatory cytokines by inhibiting NF-kappaB pathway in macrophages and splenocytes*. *Biochim Biophys Acta*, 2013.
181. McKinsey, T.A., et al., *Class II histone deacetylases confer signal responsiveness to the ankyrin-repeat proteins ANKRA2 and RFXANK*. *Mol Biol Cell*, 2006. **17**(1): p. 438-47.
182. Jeong, Y., et al., *Histone deacetylase isoforms regulate innate immune responses by deacetylating mitogen-activated protein kinase phosphatase-1*. *J Leukoc Biol*, 2014. **95**(4): p. 651-9.
183. Berghaus, L.J., et al., *Innate immune responses of primary murine macrophage-lineage cells and RAW 264.7 cells to ligands of Toll-like receptors 2, 3, and 4*. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 2010. **33**(5): p. 443-54.
184. McKinsey, T.A., et al., *Signal-dependent nuclear export of a histone deacetylase regulates muscle differentiation*. *Nature*, 2000. **408**(6808): p. 106-11.
185. Eom, G.H. and H. Kook, *Posttranslational modifications of histone deacetylases: implications for cardiovascular diseases*. *Pharmacol Ther*, 2014. **143**(2): p. 168-80.
186. Wright, S.D., et al., *CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein*. *Science*, 1990. **249**(4975): p. 1431-3.
187. Kennedy, M.K., et al., *CD40/CD40 ligand interactions are required for T cell-dependent production of interleukin-12 by mouse macrophages*. *Eur J Immunol*, 1996. **26**(2): p. 370-8.
188. von Delwig, A., et al., *The route of bacterial uptake by macrophages influences the repertoire of epitopes presented to CD4 T cells*. *Eur J Immunol*, 2002. **32**(12): p. 3714-9.

189. Georgakopoulos, T., et al., *Integrin CD11c contributes to monocyte adhesion with CD11b in a differential manner and requires Src family kinase activity.* Mol Immunol, 2008. **45**(13): p. 3671-81.
190. Stypula-Cyrus, Y., et al., *HDAC up-regulation in early colon field carcinogenesis is involved in cell tumorigenicity through regulation of chromatin structure.* PLoS One, 2013. **8**(5): p. e64600.
191. Moreno, D.A., et al., *Differential expression of HDAC3, HDAC7 and HDAC9 is associated with prognosis and survival in childhood acute lymphoblastic leukaemia.* Br J Haematol, 2010. **150**(6): p. 665-73.
192. Milde, T., et al., *HDAC5 and HDAC9 in medulloblastoma: novel markers for risk stratification and role in tumor cell growth.* Clin Cancer Res, 2010. **16**(12): p. 3240-52.
193. Guha, M. and N. Mackman, *LPS induction of gene expression in human monocytes.* Cell Signal, 2001. **13**(2): p. 85-94.
194. Hotta, T., et al., *Lipopolysaccharide-induced colitis in rabbits.* Res Exp Med (Berl), 1986. **186**(1): p. 61-9.
195. Aung, H.T., et al., *LPS regulates proinflammatory gene expression in macrophages by altering histone deacetylase expression.* FASEB J, 2006. **20**(9): p. 1315-27.
196. Jiang, M., et al., *Dysregulated expression of miR-146a contributes to age-related dysfunction of macrophages.* Aging Cell, 2012. **11**(1): p. 29-40.
197. Dangond, F. and S.R. Gullans, *Differential expression of human histone deacetylase mRNAs in response to immune cell apoptosis induction by trichostatin A and butyrate.* Biochem Biophys Res Commun, 1998. **247**(3): p. 833-7.
198. Poltorak, A., et al., *Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene.* Science, 1998. **282**(5396): p. 2085-8.
199. Janssens, S., et al., *Regulation of interleukin-1- and lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation by alternative splicing of MyD88.* Curr Biol, 2002. **12**(6): p. 467-71.
200. Kobayashi, K., et al., *IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling.* Cell, 2002. **110**(2): p. 191-202.
201. Kinjyo, I., et al., *SOCS1/JAB is a negative regulator of LPS-induced macrophage activation.* Immunity, 2002. **17**(5): p. 583-91.
202. Sakurai, A., N. Satomi, and K. Haranaka, *Tumour necrosis factor and the lysosomal enzymes of macrophages or macrophage-like cell line.* Cancer Immunol Immunother, 1985. **20**(1): p. 6-10.
203. Carballo, E., W.S. Lai, and P.J. Blakeshear, *Feedback inhibition of macrophage tumor necrosis factor-alpha production by tristetraprolin.* Science, 1998. **281**(5379): p. 1001-5.
204. Lee, C.W., et al., *Tumor necrosis factor-alpha enhances neutrophil adhesiveness: induction of vascular cell adhesion molecule-1 via activation of Akt and CaM kinase II and modifications of histone acetyltransferase and histone deacetylase 4 in human tracheal smooth muscle cells.* Mol Pharmacol, 2008. **73**(5): p. 1454-64.
205. Yan, J., et al., *Nuclear corepressor is required for inhibition of phosphoenolpyruvate carboxykinase expression by tumor necrosis factor-alpha.* Mol Endocrinol, 2007. **21**(7): p. 1630-41.
206. Marodi, L. and L.D. Notarangelo, *Immunological and genetic bases of new primary immunodeficiencies.* Nat Rev Immunol, 2007. **7**(11): p. 851-61.

207. Lorsbach, R.B., et al., *Expression of the nitric oxide synthase gene in mouse macrophages activated for tumor cell killing. Molecular basis for the synergy between interferon-gamma and lipopolysaccharide.* J Biol Chem, 1993. **268**(3): p. 1908-13.
208. Costelloe, E.O., et al., *Regulation of the plasminogen activator inhibitor-2 (PAI-2) gene in murine macrophages. Demonstration of a novel pattern of responsiveness to bacterial endotoxin.* J Leukoc Biol, 1999. **66**(1): p. 172-82.
209. Sweet, M.J., et al., *IFN-gamma primes macrophage responses to bacterial DNA.* J Interferon Cytokine Res, 1998. **18**(4): p. 263-71.
210. Bosisio, D., et al., *Stimulation of toll-like receptor 4 expression in human mononuclear phagocytes by interferon-gamma: a molecular basis for priming and synergism with bacterial lipopolysaccharide.* Blood, 2002. **99**(9): p. 3427-31.
211. Ahmad-Nejad, P., et al., *Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments.* Eur J Immunol, 2002. **32**(7): p. 1958-68.
212. Held, T.K., et al., *Gamma interferon augments macrophage activation by lipopolysaccharide by two distinct mechanisms, at the signal transduction level and via an autocrine mechanism involving tumor necrosis factor alpha and interleukin-1.* Infect Immun, 1999. **67**(1): p. 206-12.
213. Schroder, K., M.J. Sweet, and D.A. Hume, *Signal integration between IFN-gamma and TLR signalling pathways in macrophages.* Immunobiology, 2006. **211**(6-8): p. 511-24.
214. Hemmi, H., et al., *A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA.* Nature, 2000. **408**(6813): p. 740-5.
215. Kawai, T. and S. Akira, *The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors.* Nat Immunol, 2010. **11**(5): p. 373-84.
216. Crabtree, T.D., et al., *Preexposure of murine macrophages to CpG oligonucleotide results in a biphasic tumor necrosis factor alpha response to subsequent lipopolysaccharide challenge.* Infect Immun, 2001. **69**(4): p. 2123-9.
217. Hasko, G., et al., *Isoproterenol inhibits Il-10, TNF-alpha, and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages.* Brain Res Bull, 1998. **45**(2): p. 183-7.
218. Kim, B.S., et al., *Inflammatory mediators are inhibited by a taurine metabolite in CpG oligodeoxynucleotide and IFN-gamma activated macrophage cell line.* J Drugs Dermatol, 2013. **12**(5): p. 551-7.
219. Choi, Y., et al., *Histone deacetylase inhibitor KBH-A42 inhibits cytokine production in RAW 264.7 macrophage cells and in vivo endotoxemia model.* Exp Mol Med, 2008. **40**(5): p. 574-81.
220. Shakespear, M.R., et al., *Histone deacetylase 7 promotes Toll-like receptor 4-dependent proinflammatory gene expression in macrophages.* J Biol Chem, 2013. **288**(35): p. 25362-74.
221. Seo, H.W., et al., *Transcriptional activation of hypoxia-inducible factor-1alpha by HDAC4 and HDAC5 involves differential recruitment of p300 and FIH-1.* FEBS Lett, 2009. **583**(1): p. 55-60.
222. Kang, S.A., et al., *Regulation of Nur77 protein turnover through acetylation and deacetylation induced by p300 and HDAC1.* Biochem Pharmacol, 2010. **80**(6): p. 867-73.
223. Tsuchiya, S., et al., *Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1).* Int J Cancer, 1980. **26**(2): p. 171-6.

224. Zhao, Q., et al., *Mycobacterium tuberculosis* serine protease Rv3668c can manipulate the host-pathogen interaction via Erk-NF-kappaB axis-mediated cytokine differential expression. *J Interferon Cytokine Res*, 2014. **34**(9): p. 686-98.
225. Hasko, G., et al., Adenosine receptor agonists differentially regulate IL-10, TNF-alpha, and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages and in endotoxemic mice. *J Immunol*, 1996. **157**(10): p. 4634-40.
226. Silswal, N., et al., Human resistin stimulates the pro-inflammatory cytokines TNF-alpha and IL-12 in macrophages by NF-kappaB-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. **334**(4): p. 1092-101.
227. Deshmane, S.L., et al., Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res*, 2009. **29**(6): p. 313-26.
228. Dinarello, C.A., et al., Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. *J Exp Med*, 1986. **163**(6): p. 1433-50.
229. Elliott, M.J., et al., Randomised double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha (cA2) versus placebo in rheumatoid arthritis. *Lancet*, 1994. **344**(8930): p. 1105-10.
230. Altwegg, R. and T. Vincent, TNF blocking therapies and immunomonitoring in patients with inflammatory bowel disease. *Mediators Inflamm*, 2014. **2014**: p. 172821.
231. Novak, T.E., et al., NF-kappa B inhibition by omega -3 fatty acids modulates LPS-stimulated macrophage TNF-alpha transcription. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2003. **284**(1): p. L84-9.
232. Permana, P.A., C. Menge, and P.D. Reaven, Macrophage-secreted factors induce adipocyte inflammation and insulin resistance. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. **341**(2): p. 507-14.
233. Roff, M., et al., Role of IkkappaBalpha ubiquitination in signal-induced activation of NFkappaB in vivo. *J Biol Chem*, 1996. **271**(13): p. 7844-50.
234. Chen, L., et al., Duration of nuclear NF-kappaB action regulated by reversible acetylation. *Science*, 2001. **293**(5535): p. 1653-7.
235. Ashburner, B.P., et al., 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*, 2001. **21**(20): p. 7065-77.
236. Chen, L.F., Y. Mu, and W.C. Greene, Acetylation of RelA at discrete sites regulates distinct nuclear functions of NF-kappaB. *EMBO J*, 2002. **21**(23): p. 6539-48.
237. Yang, X.D., et al., Functional interplay between acetylation and methylation of the RelA subunit of NF-kappaB. *Mol Cell Biol*, 2010. **30**(9): p. 2170-80.
238. Kiernan, R., et al., Post-activation turn-off of NF-kappa B-dependent transcription is regulated by acetylation of p65. *J Biol Chem*, 2003. **278**(4): p. 2758-66.
239. Glauben, R., et al., Histone deacetylases: novel targets for prevention of colitis-associated cancer in mice. *Gut*, 2008. **57**(5): p. 613-22.
240. Bank, S., et al., Associations between functional polymorphisms in the NFkappaB signaling pathway and response to anti-TNF treatment in Danish patients with inflammatory bowel disease. *Pharmacogenomics J*, 2014. **14**(6): p. 526-34.
241. Fischle, W., et al., Human HDAC7 histone deacetylase activity is associated with HDAC3 in vivo. *J Biol Chem*, 2001. **276**(38): p. 35826-35.

242. Fischle, W., et al., *Enzymatic activity associated with class II HDACs is dependent on a multiprotein complex containing HDAC3 and SMRT/N-CoR*. Mol Cell, 2002. **9**(1): p. 45-57.
243. Tong, J.J., et al., *Identification of HDAC10, a novel class II human histone deacetylase containing a leucine-rich domain*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(5): p. 1114-23.
244. Cheng, F., et al., *Divergent roles of histone deacetylase 6 (HDAC6) and histone deacetylase 11 (HDAC11) on the transcriptional regulation of IL10 in antigen presenting cells*. Mol Immunol, 2014. **60**(1): p. 44-53.
245. Usami, M., et al., *Butyrate and trichostatin A attenuate nuclear factor kappaB activation and tumor necrosis factor alpha secretion and increase prostaglandin E2 secretion in human peripheral blood mononuclear cells*. Nutr Res, 2008. **28**(5): p. 321-8.
246. Lakshmaiah, K.C., et al., *Epigenetic therapy of cancer with histone deacetylase inhibitors*. J Cancer Res Ther, 2014. **10**(3): p. 469-78.

## 8 Eidesstattliche Versicherung

Ich, Lukas Mathias Poralla, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Regulation der inflammatorischen Antwort von Makrophagen durch die Histondeacetylase 5“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE - [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Betreuerin angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet. Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§ 156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Datum

---

Unterschrift

### Anteilerklärung an der erfolgten Publikation

Lukas Mathias Poralla hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Publikation: Poralla, L., Stroh, T., Erben, U., Sittig M., Liebig, S., Siegmund, B., Glauben, R., *Histone deacetylase 5 regulates the inflammatory response of macrophages*. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2015.

Lukas Poralla hat die Experimente zu 80% geplant und zu 80% durchgeführt.

Unterschrift, Datum und Stempel der betreuenden Hochschullehrerin

---

Unterschrift des Doktoranden

---

## **9 Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.



## **Publikationsliste**

Poralla, L., Stroh, T., Erben, U., Sittig M., Liebig, S., Siegmund, B., Glauhen, R.,  
*Histone deacetylase 5 regulates the inflammatory response of macrophages.*  
Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2015.

## **10 Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Siegmund für die Überlassung des Promotionsthemas, die Aufnahme in Ihre Arbeitsgruppe sowie die umfangreiche Unterstützung und stete Ansprechbarkeit während des gesamten Prozesses dieser Arbeit.

Dem Graduiertenkolleg des Sonderforschungsbereiches 633 der Deutschen Forschungsgemeinschaft e.V. danke ich für die Weiterbildungsangebote sowie die finanzielle Unterstützung.

Rainer Glauben möchte ich nicht nur für seine sorgsame Betreuung, sondern vor allem auch für seine immer wieder aufmunternde und menschliche Art danken, die aus der Arbeitsgruppe mehr macht als nur eine Ansammlung von interessierten Wissenschaftlern.

Thorsten Stroh danke ich für die hervorragende methodische und technische Betreuung. Ohne den von ihm entwickelten Elporator wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Inka Freise danke ich für ihre geduldige Anleitung im Labor sowie ihre fortwährende Hilfsbereitschaft. Ohne ihre Unterstützung wäre ein erfolgreicher Abschluss dieser Arbeit nicht gelungen.

Arvind Batra sowie allen weiteren Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Siegmund bin ich sehr dankbar für die angenehme und von gegenseitiger Hilfsbereitschaft geprägte Arbeitsatmosphäre.

Ein ganz besonders herzlicher Dank richtet sich an Ulrike Erben und ihre Arbeitsgruppe. Sie hat nicht nur mein Interesse an der experimentellen Wissenschaft geweckt, sie war auch während der gesamten Arbeit stets mit ihren offenen Ohren und weiterführenden Ratschlägen ein unersätzlicher Rückhalt.

Mein größter Dank gilt jedoch meinen Eltern, meiner Familie und meiner Lebensgefährtin Maïke, die in jeder nur erdenklichen Form für mich da waren. Ohne ihr Vertrauen und ihre unermüdliche Unterstützung wäre ich nie so weit gekommen. Ihnen widme ich diese Arbeit.