

Aus der Klinik für Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Immunmodulation muriner Makrophagen durch Inhibition von
Histondeazetylasen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Martin Wetzel

aus Stendal

Datum der Promotion: 04.06.2021

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Abbildungsnachweis | IV |
| Abkürzungen | V |
| 1 Zusammenfassung | 2 |
| 2 Einleitung | 6 |
| 2.1 <i>Chronisch entzündliche Darmerkrankungen</i> | 6 |
| 2.2 <i>Zelluläre Immunreaktionen</i> | 9 |
| 2.3 <i>Polarisierung von Immunzellen</i> | 11 |
| 2.4 <i>Lysinazetylierung</i> | 16 |
| 3 Fragestellung | 19 |
| 4 Material und Methoden | 20 |
| 4.1 <i>Material</i> | 20 |
| 4.2 <i>Methoden</i> | 26 |
| 4.3 <i>Gewinnung und Isolation von Makrophagen aus murinem Knochenmark</i> | 27 |
| 4.4 <i>Naive T-Helfer-Lymphozyten mit Spezifität für Ovalbumin</i> | 28 |
| 4.5 <i>Messung der Phagozytose</i> | 30 |
| 4.6 <i>Proteinnachweis mit Western Blot</i> | 31 |
| 4.7 <i>Magnetaktivierte Zellseparation</i> | 33 |
| 4.8 <i>Durchflusszytometrie</i> | 34 |
| 4.9 <i>Durchflusszytometrische Messung löslicher Zytokine</i> | 37 |
| 4.10 <i>Statistische Auswertung</i> | 38 |
| 5 Ergebnisse | 40 |
| 5.1 <i>Unveränderte Vitalität muriner Makrophagen unter niedrigen Givinostat-Konzentrationen</i> | 40 |
| 5.2 <i>Wirknachweis der Hyperazetylierung</i> | 41 |

| | | |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 5.3 | <i>Modulation des Immunphänotyps muriner Makrophagen</i> | 42 |
| 5.4 | <i>Veränderung des Zytokinprofils der Makrophagen</i> | 44 |
| 5.5 | <i>Verminderte Fähigkeit zur Aktivierung von CD4⁺ T-Lymphozyten</i> | 46 |
| 5.6 | <i>Verminderte Phagozytose von Latexmikrokügelchen durch Makrophagen</i> ... | 48 |
| 5.7 | <i>Verminderte Sekretion des löslichen IL-6-Rezeptors durch Makrophagen</i> | 48 |
| 6 | Diskussion | 50 |
| 6.1 | <i>Einordnung der eingesetzten Konzentration von Givinostat</i> | 50 |
| 6.2 | <i>Die phänotypische und funktionelle Modulation muriner Makrophagen durch Givinostat verdeutlicht den kontinuierlichen Übergang von M1/M2-Polarisierungszuständen</i> | 51 |
| 6.3 | <i>Relevanz der beobachteten verminderten Phagozytose</i> | 53 |
| 7 | Literaturverzeichnis | 55 |
| 8 | Eidesstattliche Versicherung | 64 |
| 9 | Anteilerklärung an erfolgter Publikation | 65 |
| 10 | Lebenslauf | 66 |
| 11 | Publikationsliste | 67 |
| 12 | Danksagung | 68 |

Abbildungsnachweis

Die Abbildungen 1 – 4 wurden mit *BioRender.com* erstellt. Die Abbildungen 6 – 9, 10b und 11 wurden mit GraphPad Prism erstellt. Die Abbildung 10a wurde mit FlowJo erstellt und mit *BioRender.com* bearbeitet. Die genutzten Versionen von FlowJo und GraphPad Prism sind im Abschnitt Material und Methoden angegeben.

Abkürzungen

| | |
|-------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| AOM | Azoxymethan |
| APC | antigenpräsentierende Zelle |
| BMDM | aus Knochenmarkszellen differenzierte Makrophagen (<i>bone marrow-derived macrophages</i>) |
| CCL2 | CC-Chemokine Ligand 2 |
| CED | chronisch entzündliche Darmerkrankung(en) |
| CD | <i>cluster of differentiation</i> , Nomenklatur zur Bezeichnung von Oberflächenantigenen. Festgelegt auf den <i>Human Leukocyte Differentiation Workshops</i> |
| DAMP | schädigungsassoziierte Molekularmuster (<i>damage-associated molecular patterns</i>) |
| DAPI | 4',6-Diamidino-2-phenylindol |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DSS | Dextrannatriumsulfat (<i>dextran sodium sulfate</i>) |
| ELISA | Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>) |
| FBS | Fetales bovines Serum |
| f.c. | finale Konzentration |
| FITC | Fluorescein-Isothiocyanat |
| FSC | <i>forward scatter</i> |
| gp130 | Glykoprotein 130 (syn. CD130) |
| IL | Interleukin |
| IFNγ | Interferon- γ |
| iTreg | induzierte regulatorische T-Zelle(n) |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| MACS | Magnetaktivierte Zellseparation |
| MAMP | mikrobenassoziierte Molekularmuster (<i>microbe-associated molecular patterns</i>) |
| MHC | Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>) |
| OVA₃₂₃₋₃₃₉ | Endopeptid der Aminosäuren 323-339 aus Hühnerovalbumin |
| PBMC | mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut (<i>peripheral blood mononuclear cells</i>) |
| PE | Phycoerythrin |
| PI | Propidiumjodid |
| PRR | Mustererkennungsrezeptoren (<i>pattern recognition receptors</i>) |
| sIL6R | löslicher Rezeptor für Interleukin 6 (<i>soluble interleukin 6 receptor</i>) |

| | |
|-------------------------------|-------------------------------------------|
| SSC | <i>sideward scatter</i> |
| TGF-β | transformierender Wachstumsfaktor β |
| Th | T-Helfer-Lymphozyt |
| TLR | <i>Toll-like</i> -Rezeptor(en) |
| TNBS | Trinitrobenzoesäure |
| TNFα | Tumornekrosefaktor α |
| TsA | Trichostatin A |

1 Zusammenfassung

Einleitung

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen zeichnen sich durch eine chronische Entzündung aus, deren Pathogenese unvollständig verstanden ist. Jedoch führt eine gestörte intestinale Barriere zu einer vermehrten Translokation der intestinalen Mikrobiota in die Lamina propria. Makrophagen gehören zu den ersten Zellen, die mit der Mikrobiota in Kontakt kommen. Infiltrierende Makrophagen sind die Hauptproduzenten von Tumornekrosefaktor α , dessen Blockade einen wesentlichen therapeutischen Ansatz darstellt.

Auf der Suche nach neuen Therapieansätzen zeigten Inhibitoren von Histondeazetylasen (HDAC) anti-inflammatorische Effekte. Einer dieser HDAC-Inhibitoren ist das oral verfügbare Givinostat, welches in murinen Kolitismodellen eine klinische und histologische Besserung erzielen konnte.

Es stellte sich die Frage, ob ein Teil der Beobachtungen *in vivo* durch einen Effekt von Givinostat auf intestinale Makrophagen zu erklären ist.

Methoden

Makrophagen wurden aus dem Knochenmark gesunder C57BL/6-Mäuse gewonnen und anschließend mit unterschiedlichen Konzentrationen von Givinostat inkubiert. Anschließend wurden sie auf Veränderungen ihrer Oberflächenmoleküle, ihrer Zytokinproduktion sowie ihrer Fähigkeit zur Phagozytose nicht-opsonisierter Latexkügelchen hin untersucht. Außerdem wurde ihre Fähigkeit zur spezifischen Antigenpräsentation gegenüber naiven CD4⁺ T-Lymphozyten hinsichtlich deren Proliferation und Zytokinproduktion untersucht.

Ergebnisse

Givinostat änderte den Immunphänotyp der Makrophagen in Richtung eines anti-inflammatorischen M2-Zustands. Die Lipopolysaccharid-induzierte Expressionssteigerung der Alphakette des Interleukin-6-Rezeptors (CD126) wurde durch Givinostat deutlich supprimiert, ebenso wie die Sekretion von Interleukin (IL-) 6, IL-12 und IL-10. Givinostat verringerte die Fähigkeit von Makrophagen, CD4⁺ T-

Lymphozyten antigenspezifisch zu aktivieren. Die Phagozytose von Latexkügelchen wurde ebenfalls inhibiert.

Schlussfolgerungen

Makrophagen wiesen eine phänotypische und funktionelle Modulierung durch Givinostat in Richtung eines anti-inflammatorischen Subtyps auf. Die Veränderungen lassen den Schluss zu, dass eine Wirkung von Givinostat auf intestinale Makrophagen für einen Teil der klinischen Besserung in murinen Kolitismodellen verantwortlich ist.

Abstract

Introduction

Inflammatory bowel disease is characterized by chronic inflammation, the pathogenesis of which is not fully understood. However, an impaired intestinal barrier leads to an increased translocation of the microbiota into the lamina propria. Macrophages are among the first cells to come into contact with the microbiota. Infiltrating macrophages are the main producers of tumor necrosis factor, the blocking of which is a key therapeutic approach. In the search for new therapeutic approaches, inhibitors of histone deacetylases (HDAC) showed anti-inflammatory effects. One of these HDAC inhibitors is the orally available givinostat, which has shown clinical and histological improvement in murine colitis models. The question arose whether some of the observations *in vivo* could be explained by an effect of givinostat on intestinal macrophages.

Methods

Macrophages were obtained from the bone marrow of healthy C57BL/6 mice and then incubated with different concentrations of givinostat. They were then examined for changes of their surface molecules, their cytokine production and their ability to phagocytose non-opsonized latex beads. In addition, their ability to specifically present antigens to naive CD4⁺ T lymphocytes was investigated with respect to their proliferation and cytokine production.

Results

Givinostat changed the immunophenotype of macrophages towards an anti-inflammatory M2 state. The lipopolysaccharide-induced increase of the expression of the interleukin-6 receptor alpha chain (CD126) was significantly suppressed by givinostat, as was the secretion of interleukin (IL-)6, IL-12 and IL-10. Givinostat reduced the ability of macrophages to antigen-specifically activate CD4⁺ T lymphocytes. Phagocytosis of latex beads was also inhibited.

Conclusions

Macrophages exhibited phenotypic and functional modulation by givinostat towards an anti-inflammatory subtype. The changes suggest that an effect of givinostat on

intestinal macrophages is responsible for part of the clinical improvement in murine colitis models.

2 Einleitung

2.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Zu den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (**CED**) werden als Hauptvertreter Morbus Crohn sowie Colitis ulcerosa gezählt. Beide Erkrankungen sind zwar verhältnismäßig selten, zeigen jedoch eine zunehmende Inzidenz¹. Zudem ist ihre klinische und gesundheitsökonomische Relevanz hoch: Eine meist späte Erstdiagnose, ein chronischer Verlauf mit schubweisen Aktivitätszunahmen sowie erforderliche chirurgische Maßnahmen schränken die Lebensqualität der Betroffenen oft stark ein. Durch das erstmalige Auftreten meist zwischen der zweiten und vierten Lebensdekade¹ sind Erwachsene im berufsfähigen Alter betroffen; Zeiten von Arbeitsunfähigkeit sind nicht selten länger andauernd und mit entsprechend hohen Kosten für die Gesellschaft verbunden^{2,3}.

Da beide Erkrankungen eine familiäre Häufung und ein bevorzugtes Auftreten in teils ethnisch, teils geografisch definierten Populationen^{4,5} zeigen, wurde eine genetische Komponente angenommen. Tatsächlich zeigten sich bis heute mehr als 200 Genloci⁶, die mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten einer CED assoziiert sind. Beide Erkrankungen besitzen neben gemeinsamen jedoch auch jeweils spezifische Risikoallele. Dies ist bereits ein Hinweis auf eine zumindest in Teilen divergente Pathogenese beider Erkrankungen. Die funktionelle Zuordnung der mit einer CED-assoziierten Genloci bietet Hinweise: Sie reichen von der mikrobiellen Abwehr, der Beeinflussung angeborener und erworbener Immunreaktionen über die epitheliale Barrierefunktion zu Gewebereparaturmechanismen⁵. Damit zeigen sie die multifaktorielle Genese der Erkrankungen auf und weisen auf mögliche Therapieansätze hin. Ihrer Vielzahl zum Trotz sind die bekannten Genloci jedoch nur für maximal ein Viertel der Heritabilität verantwortlich⁷.

Aktuelle Modellvorstellungen der Pathogenese CED können auf vier wesentliche Ebenen abstrahiert werden: Umwelteinflüsse, die Interaktion mit dem intestinalen Mikrobiom, eine Störung der intestinalen Barriere sowie dysregulierte Immunreaktionen^{7,8}.

2.1.1 Umwelteinflüsse

Eine schwedische Studie⁹ an Migranten aus Ländern mit einer niedrigen Inzidenz an CED zeigten eine Risikoerhöhung nach ihrer Immigration nach Schweden. Ihr

Erkrankungsrisiko stieg dabei in Abhängigkeit des Alters bei der Migration. Die in Schweden aufgewachsene Folgegeneration zeigte nochmals höhere Inzidenzraten im Vergleich zum Herkunftsland – auch wenn sie gering unterhalb der durchschnittlichen Inzidenzraten von Schweden ohne Migrationshintergrund lagen. Diese Datenanalyse stellte elegant dar, dass Umwelteinflüsse einen erheblichen Teil des Erkrankungsrisikos ausmachen⁷. Beispielsweise stellt Rauchen hingegen einen Risikofaktor für Morbus Crohn¹⁰, jedoch einen eher protektiven Faktor für die Colitis ulcerosa¹¹ dar.

Eine verminderte Exposition des Immunsystems im Kinder- und Jugendalter gegenüber mikrobiellen Antigenen wurde als wesentlicher Faktor postuliert, um die höhere Inzidenz in nördlichen und entwickelten Regionen zu erklären¹². Eine Fall-Kontroll-Studie zeigte signifikant niedrigere Mengen an Lipopolysaccharid im Staub der häuslichen Umgebung von CED-erkrankten Kindern im Vergleich zu gesunden Kontrollen¹³. Diese Ergebnisse begründen die so genannte „Hygiene-Hypothese“, der zufolge die fortschreitende Verbesserung der hygienischen Bedingungen eine Verminderung bestimmter Mikroorganismen („alte Freunde“) im städtischen Lebensumfeld zur Folge hatte, die regelhaft zu tolerogenen Immunantworten führen¹²; die nun fehlende Auseinandersetzung mit ihnen begünstigt die Tendenz zu inflammatorischen Antworten¹². So werden hypererge Reaktionen auf Antigene begünstigt, welche sonst eher tolerogene Reaktionen hervorgerufen hätten¹⁴, z. B. Stimuli durch die kommensale Mikrobiota von Haut und Darm.

2.1.2 Intestinale Mikrobiota

Die Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota ist bei Colitis ulcerosa, zum geringeren Teil auch bei Morbus Crohn, im Vergleich zu Gesunden verändert und weist eine verminderte Vielfalt der Bakterienspezies auf¹⁵, wobei für einige vermehrt auftretende Taxa auch eine pathogene Wirkung postuliert wird^{16,17}. Weiterhin unklar ist, ob diese Dysbiose begünstigend (oder gar ursächlich) für das Auftreten einer CED ist, oder vielmehr eine Folge der intestinalen Entzündung und damit ein Epiphänomen der Erkrankung selbst darstellt. Unstrittig ist, dass die immunologische Reaktion auf intestinale Mikroorganismen überschießend ist^{14,18} und die chronische Entzündung aufrechterhält. In Übereinstimmung mit der „Hygiene-Hypothese“ zeigten sich Störungen der intestinalen Mikrobiota im Kindesalter, z. B. infolge antibiotischer Therapien, mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten einer CED assoziiert¹⁹.

2.1.3 Intestinale Barriere

Der mechanische Lückenschluss des intestinalen Epithelzellverbands durch Zelladhäsionskomplexe (*tight junctions*) grenzt den Organismus gegenüber der Außenwelt des Darmlumens ab. Eine hochvisköse Mucus-Schicht²⁰ und hierin befindliche antimikrobielle Peptide²¹ und Antikörper vom Typ Immunglobulin A²² tragen darüber hinaus dazu bei, dass Kommensale diese physische Barriere möglichst gar nicht erst erreichen. Direkt hinter dem Epithelzellverband sind nach dennoch erfolgreichem Übertritt von Mikroorganismen Granulozyten und Makrophagen in der Lage, diese abzutöten und eine adaptive Immunantwort durch Präsentation der Antigene zu induzieren.

Histologische und physiologische Analysen von Darmbiopsien von CED-Patienten zeigen eine erhöhte Durchlässigkeit dieser intestinalen Barriere^{21,23,24}. Dies ermöglicht einen Einstrom von Pathogenen mit ihren antigenen Strukturen. Das unter Bedingungen der Homöostase vorherrschende anti-inflammatorische Milieu der intestinalen Mukosa weicht einer ausgeprägt inflammatorischen Immunreaktion^{8,25}.

2.1.4 Dysregulierte Immunreaktionen

Kommt es durch Schädigung der mukosalen Barriere zu einem Übertritt luminaler Mikroorganismen und antigener Substanzen, begegnet der Organismus diesen mit einer akuten inflammatorischen Antwort. Diese Entzündungsreaktion ist zellulär durch Rekrutierung neutrophiler Granulozyten und Makrophagen, also Vertreter der angeborenen Immunantwort, dominiert^{26,27}. Der Zerstörung der eingedrungenen Bakterien durch *oxidative burst* bzw. ihrer phagozytotischen Aufnahme und anschließenden lysosomalen Desintegration folgt durch enge Immunregulation die rasche Beendigung der Entzündungsreaktion und Wiederherstellung der mukosalen Barriere^{28,29}. Die rasche Beendigung der Entzündungsreaktion verhindert einen weitergehenden durch sie hervorgerufenen Gewebeschaden und ermöglicht die Regeneration der Mukosa.

Den Erkrankungen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa ist eine unzureichende Regulation der Entzündungsreaktion gemeinsam^{8,25,30}, wodurch ihre Chronifizierung begünstigt wird. In deren Zuge wandern vermehrt T-Lymphozyten und Plasmazellen als Vertreter der adaptiven Immunantwort (siehe unten) in das entzündete Gewebe ein^{27,31-33}. Die fortbestehende entzündungsbedingte Schädigung der Epithelzellen erhält ihrerseits durch molekulare Signale der Schädigung (*damage-associated molecular*

patterns, **DAMP**) und durch mikrobielle Antigene infolge der fortbestehenden Barrierestörung den Entzündungsprozess aufrecht^{8,25}.

Die für die Pathogenese der CED und im Zusammenhang dieser Arbeit relevanten Merkmale der zellulären Immunantwort werden im Abschnitt 2.2 ausführlicher dargestellt.

2.1.5 Tiermodelle

Für experimentelle Untersuchungen sind mehrere Tiermodelle chronisch entzündlicher Darmerkrankungen etabliert, die jeweils spezifische Ebenen abbilden. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit sollen die folgenden Beispiele kurz erläutert werden:

Ein intestinale Barrierestörung wird in Mäusen chemisch induziert, indem Dextran-natriumsulfat (**DSS**) über mehrere Tage dem Trinkwasser beigemischt wird³². Zur Untersuchung der entzündungsassoziierten Entwicklung von Neoplasien wird dieses Modell um das karzinogene Azoxymethan (**AOM**) zum AOM/DSS-Modell³⁴ erweitert.

Beim TNBS-Modell³⁵ der Kolitis wird durch rektale Instillation von Alkohol zunächst eine intestinale Barrierestörung erzeugt und anschließend eine Immunreaktion durch Haptenisierung mittels Trinitrobenzoesäure (**TNBS**) provoziert.

2.2 Zelluläre Immunreaktionen

Immunreaktionen werden je nach Art der Antigenerkennung in angeborene oder adaptive Bestandteile eingeteilt. Zellen des angeborenen Immunsystems erkennen Mikroorganismen mit breiter Spezifität anhand molekularer Muster, während Zellen der adaptiven Immunsystems eine hohe Spezifität gegenüber definierten antigenen Strukturen aufweisen.

2.2.1 Angeborenes Immunsystem

Im Lauf der Evolution haben sich in mikrobiellen Lebewesen bestimmte wiederkehrende molekulare Muster erhalten. Dies können z. B. eine bestimmte Abfolge von Zuckermolekülen an der Oberfläche, Nukleinsäuren, Peptide oder Bestandteile der mikrobiellen Zellmembran oder -wand sein, und werden als Mikroben-assoziierte Molekularmuster (**MAMP**) bezeichnet³⁶. Deren Erkennung durch entsprechende Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*, **PRR**) erlaubt es einer einzelnen Zelle, eine Vielzahl von Pathogenen erkennen und auf sie reagieren zu

können³⁶. Sowohl professionelle Immunzellen als auch Epithel- und Stromazellen, z. B. des Darms, weisen PRR auf^{37,38}. Binden diese an mikrobielle Oberflächenmoleküle, aktivieren sie die Sekretion inflammatorischer Zytokine wie Tumornekrosefaktor α (**TNF α**) oder Interleukin (**IL-**)1 β ³⁹ sowie chemotaktische Faktoren wie IL-8⁴⁰. Hierüber werden professionelle Immunzellen (Neutrophile, Makrophagen, Lymphozyten) zur Abwehr rekrutiert. Mustererkennungsrezeptoren existieren auch für schädigungsassoziierte molekulare Muster (**DAMP**)^{41,42}. Diese umfassen intrazelluläre Moleküle, welche bei unkontrolliertem Zelltod (Nekrose) frei werden oder aktiv sezerniert werden⁴².

Zur angeborenen Immunität zählen unter anderem Granulozyten, dendritische Zellen und Makrophagen. Granulozyten können Mikroorganismen durch Sekretion reaktiver Sauerstoffspezies und proteolytischer Substanzen sowie durch deren Aufnahme mittels Phagozytose unschädlich machen^{28,43}. Auch dendritische Zellen sind Phagozyten⁴⁴. Ebenso wie Makrophagen, deren Phagozytose-Aktivität deutlich höher ist⁴⁵, sind sie als antigenpräsentierende Zellen (**APC**) in der Lage, Peptide des Pathogens auf ihrer Zelloberfläche zu präsentieren⁴⁵. Dieser Prozess erfolgt über Moleküle des Haupthistokompatibilitätskomplexes (**MHC**), welche die Peptide als Antigene den Zellen des adaptiven Immunsystems präsentieren⁴⁶, und stellt das wichtigste Bindeglied zum adaptiven Immunsystem dar.

Durch Sekretion von Signalmolekülen, Chemokinen und Zytokinen, können intestinale Epithelzellen und professionelle Immunzellen weitere Immunzellen des angeborenen sowie des adaptiven Immunsystems zum Ort der Entzündung rekrutieren^{47,48}. Zugleich stellen sie den Mechanismus dar, die Immunantwort zu regulieren; so können die spezifische Art der Immunabwehr (wie z. B. Antikörper, Zytotoxizität, Granulome) als auch die Intensität der Entzündungsreaktion (negatives Feedback) justiert werden^{26,49,50}.

2.2.2 Adaptives Immunsystem

B- und T-Lymphozyten sind die zellulären Bestandteile des adaptiven Immunsystems. Es stellt über eine Antigenpezifität eine möglichst zielgenaue Immunantwort bereit, welche den entstehenden Kollateralschaden möglichst geringhält. T-Lymphozyten können in zytotoxische (CD8⁺) und Helfer- (CD4⁺) T-Lymphozyten unterteilt werden⁵¹. Erstere töten Zellen direkt ab; letztere sind Vermittler, die durch Zytokinsignale an und Zell-Zell-Kontakte zu Effektorzellen das Spektrum der Immunantwort von Zytotoxizität

über eine humorale Antwort durch Antikörper bis zu Toleranz formen⁵². B-Lymphozyten sind für die Produktion antigenspezifischer Antikörper zuständig, die sie als Plasmazellen sezernieren. Sie können ihr spezifisches Antigen über den B-Zell-Rezeptor direkt erkennen⁵³; demgegenüber ist die Antigenerkennung von T-Lymphozyten der MHC-Restriktion unterworfen, bei der Peptide durch MHC durch andere körpereigene Zellen präsentiert werden. Zytotoxische T-Lymphozyten nutzen MHC-I, welche ubiquitär von Zellen des Organismus exprimiert werden, um körperfremde – z. B. viral eingeschleuste – Peptide zu erkennen; Helfer-T-Lymphozyten benötigen eine Antigenpräsentation mittels MHC Klasse II (**MHC-II**)⁵¹. Diese werden konstitutiv von APC exprimiert, können aber durch Interferon- γ (**IFN γ**) auch auf zahlreichen anderen Zellarten wie auch Epithelzellen induziert werden⁵⁴.

2.3 Polarisierung von Immunzellen

2.3.1 Polarisierung von CD4⁺ T-Lymphozyten

Die Bezeichnung T-Helferzelle rührt daher, dass CD4⁺ T-Lymphozyten großenteils nicht zur direkten Beseitigung eines Pathogens führen, sondern stattdessen die Immunantwort durch Einfluss auf andere Immunzellen vermitteln⁵⁵. Angesichts der Vielzahl von – teilweise harmlosen – Antigenen, denen das Immunsystem gegenübersteht, erfordert diese Vermittlerrolle ein notwendiges Maß an Flexibilität. Diese findet ihre Entsprechung in verschiedenen Polarisierungszuständen von CD4⁺ T-Lymphozyten, welche nach den produzierten Signaturzytokinen und der Expression spezifischer Transkriptionsfaktoren definiert werden⁵². Die ursprüngliche Annahme eines Th1/Th2-Dualismus⁵⁶ ist inzwischen einer Vielzahl beschriebener und benannter Zustände gewichen, deren wichtigste Vertreter hier kurz vorgestellt werden:

Th1-Zellen zeichnen sich durch Sekretion von IFN γ und TNF α ⁵⁷ aus und exprimieren den Transkriptionsfaktor T-bet sowie den Chemokinrezeptor CXCR3⁵². Sie werden für die Abwehr intrazellulärer Pathogene mittels zytotoxischer T-Zellen (CD8⁺) und die Aktivierung von Makrophagen benötigt^{52,57}. Die Differenzierung naiver CD4⁺ T-Lymphozyten zu Th1 erfolgt bei Anwesenheit von IL-2, IL-12 und IFN γ ^{49,57}.

Th17-Zellen sezernieren IL-17A, IL-17F sowie IL-22 und exprimieren RORC sowie den Chemokinrezeptor CCR6⁵². Sie sind relevant in der Abwehr von Bakterien und Pilzen⁴⁹ und rekrutieren neutrophile Granulozyten⁵². Sie differenzieren bei Anwesenheit von

IL-6 und transformierendem Wachstumsfaktor β (**TGF- β**)⁴⁹. Th17-Zellen sind mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen⁵⁸ sowie Morbus Crohn¹⁴ assoziiert.

Th2-Zellen sezernieren die Interleukine IL-4, IL-5 und IL-13 und exprimieren GATA-3 sowie die Chemokinrezeptoren CCR3 und CRTh2⁵². Sie vermitteln die Abwehr extrazellulärer Pathogene durch Aktivierung von eosinophilen Granulozyten und Mastzellen und veranlassen B-Lymphozyten zum Klassenwechsel auf Immunglobulin E⁵⁷. Die Anwesenheit von IL-2 und IL-4 begünstigt ihre Differenzierung⁴⁹.

Induzierte regulatorische T-Zellen (**iTreg**) sezernieren **TGF- β** und exprimieren FOXP3⁵². Sie unterdrücken die proliferative Antwort von T-Lymphozyten und deren Aktivierung durch dendritische Zellen⁵⁹. In Mäusen zeigen sie sich sowohl *in vitro* als auch *in vivo* funktionell zu den im Thymus differenzierten regulatorischen T-Zellen funktionell vergleichbar⁵⁵. In peripheren Geweben können iTregs aus naiven CD4+ T-Zellen durch Anwesenheit von TGF- β während der T-Zell-Stimulation differenzieren⁶⁰.

Eine einmal erfolgte Differenzierung in einen Polarisierungszustand ist dabei plastisch; die Expression der für die anderen Polarisationszustände erforderlichen Transkriptionsfaktoren wird nicht vollständig unterbunden, sondern auf niedrigem Niveau gehalten^{52,57,61}. Hierdurch ist eine Anpassung der Funktion an veränderte Umstände möglich⁶¹.

2.3.2 Polarisierung von Makrophagen

Auch Makrophagen weisen eine hohe Variabilität von Phänotyp und Funktionen auf^{62,63}. In Analogie zur Polarisierung der Th-Antwort ist auch die Funktion der Makrophagen von ihrer Umgebung abhängig. Neben Zytokinen spielen besonders MAMP wie z. B. Lipopolysaccharid (**LPS**) eine Rolle, welche bei zusätzlichem Vorliegen von DAMP als Hinweis auf geschädigtes Gewebe zu einer inflammatorischen Polarisierung der Makrophagen beitragen⁴¹. Die möglichen Polarisierungszustände von Makrophagen werden aktuell als Punkte auf einem Spektrum verstanden^{48,62,64}.

In Anlehnung an die ursprüngliche Einteilung von T-Helfer-Lymphozyten in Th1 und Th2⁵⁶ erfolgte ursprünglich die Einteilung funktionell unterschiedlicher Makrophagen-Polarisationszustände in **M1** und **M2**. Der Zustand M1 bezeichnet die „klassisch“ aktivierten Makrophagen mit pro-inflammatorischen Eigenschaften. Die Bezeichnung „klassisch“ spiegelt vor allem wider, dass dieser Funktionszustand lange Zeit als

einzigem Funktionszustand eines „aktivierten“ Makrophagen angenommen wurde. Ein „alternativer“, weniger inflammatorischer Polarisierungszustand M2 wurde erstmals im Rahmen von Untersuchungen von Makrophagen im direkten Umfeld von Neoplasien beschrieben⁶⁵. Bald offenbarte sich eine Vielzahl möglicher Polarisierungszustände, deren Einteilung in die Subtypen M2a-M2c vorgeschlagen wurden⁶⁶. Deren Anwendung zur Charakterisierung von Zellen *in vivo* ist jedoch unscharf⁶⁷. Zur Charakterisierung von Zuständen *in vitro* wurde die Angabe des polarisierenden Agens, z. B. M(IFN γ), vorgeschlagen⁶⁴. Diese Nomenklatur trägt der Tatsache Rechnung, dass zur Polarisierung *in vitro* unterschiedliche Protokolle genutzt werden, deren resultierenden Polarisierungszustände trotz Zuordnung zum gleichen Subtyp (z. B. M2b) Unterschiede aufweisen⁶⁴. Die vorliegende Arbeit wird diese Nomenklatur auch für die Einordnung der beobachteten Veränderungen im Vergleich zu schon vorliegenden Daten nutzen.

2.3.3 Marker zur Charakterisierung von Makrophagen

Oberflächenantigene

Das Adhäsionsmolekül **Integrin α -X (CD11c)** bindet an ICAM⁶⁸, ermöglicht es Zellen, mit Kollagen zu interagieren⁶⁹. Zusammen mit Integrin β -2 (CD18) bildet es den Komplementrezeptor CR4⁶⁸, welcher spezifisch für das Proteinfragment iC3b aus der Komplementkaskade ist.

Der **Mannoserezeptor (CD206)** gehört in die Superfamilie der C-Typ-Lektine und bindet Kohlenhydratreste an glykosylierten Proteinen⁷⁰ – hierzu zählen sowohl körpereigene Proteine als auch Bestandteile von Pathogenen⁷⁰. Auch nicht-glykosyliertes Kollagen (Kollagene I-IV) sowie einige Allergene sind Liganden des Mannoserezeptors⁷¹ ebenso wie Gewebsplasminogenaktivator, lysosomale Hydrolase und Myeloperoxidase⁷¹; letztere liegen im Bereich geschädigten Gewebes mit neutrophiler Infiltration vor.

Der **Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)** ist ein Komplex an Genloci, welche für die Proteine MHC Klasse I (MHC-I) und MHC Klasse-II (**MHC-II**) kodieren⁷². Beide Proteine dienen der Präsentation von Peptiden (Antigenen) gegenüber T-Lymphozyten. MHC-I wird auf jeder kernhaltigen Zelle konstitutiv exprimiert und ermöglicht die Präsentation von Peptiden aus dem Zytosol und dem Zellkern⁷³, was die Erkennung von virusinfizierten Zellen bedeutsam ist. Die Bindung des Ko-Rezeptors CD8 an MHC-I ist für die Aktivierung zytotoxischer T-Lymphozyten (CD8⁺)

erforderlich⁷⁴. MHC-II wird von professionellen APC exprimiert und im endosomalen Kompartiment mit Peptiden beladen⁷³. Über den Ko-Rezeptor CD4 können T-Helferzellen (CD4⁺ T-Lymphozyten) an MHC-II binden⁷³.

Die **kostimulatorischen Moleküle B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86)** sind für die Aktivierung von T-Lymphozyten über den T-Zellrezeptor erforderlich⁷⁵. Sie vermitteln ein notwendiges „Gefahrensignal“ im Kontext der Antigenpräsentation. Bindet der T-Zellrezeptor ein präsentiertes Antigen in Abwesenheit des kostimulatorischen Signals über den Rezeptor CD28 (für beide B7-Proteine), reagiert dieser T-Lymphozyt mit Anergie statt mit (inflammatorischer) Aktivierung⁷⁶.

Zytokine

Das Zytokin **TNF α** hat eine stark inflammatorische Wirkung. Nach einer Gewebsverletzung kann ein Anstieg seiner Blutkonzentration schon innerhalb weniger Minuten nachgewiesen werden⁷⁷. Es vermittelt über die Expression von Chemokinen in zahlreichen Zelltypen eine „allgemeine“ Aktivierung der Abwehrmaßnahmen des Organismus⁷⁸. CED zählen zu den Erkrankungen, die mit einer unkontrollierten Sekretion von TNF α einhergehen; seine spezifische Blockade oder die seines Rezeptors sind bewährte therapeutische Strategien bei CED⁷⁷.

CC-Chemokin Ligand 2 (**CCL2**) wirkt chemotaktisch auf Monozyten. In Bezug auf CED ist dies relevant, da die Rekrutierung von Monozyten aus dem peripheren Blut die Quelle von gewebsresidenten intestinalen Makrophagen ist⁷⁹. Die Geninaktivierung seines Rezeptors CCR2 führt im murinen DSS-Modell zu einer deutlichen Verminderung der entzündlichen Veränderungen⁷⁸ sowie zu einer verminderten entzündungsassoziierten Karzinogenese im AOM-DSS-Modell⁷⁸. Die Sekretion von CCL2 durch Makrophagen wird dem M1-Zustand zugeordnet⁵⁰. Die Überstände von ex vivo Zellkulturen aus intestinalem Gewebe von CED-Patienten weist signifikant höhere CCL2-Konzentrationen auf als nicht entzündete Kontrollen⁷⁹.

Interleukin 6 spielt eine besondere Rolle in der Homöostase der Makrophagen, besonders im Hinblick auf ihre Polarisierung, und bei der Erhaltung chronischer Entzündungen⁸⁰. Der Rezeptorkomplex für die Erkennung eines IL-6-Signals besteht aus einem Komplex aus der Alphakette (**CD126**) sowie einem Glykoprotein 130 (**CD130**)-Homodimer (**Abbildung 1 links**). Während CD126 für die spezifische Erkennung von IL-6 verantwortlich ist, dient gp130 den Zytokinen der IL-6-Familie als

gemeinsames Signaltransduktorprotein⁸¹. Dies spiegelt sich in der ubiquitären Expression von gp130 auf der Oberfläche von Zellen des gesamten Organismus wider⁸². Neben dem membrangebundenen Rezeptor für IL-6 existiert außerdem ein löslicher Rezeptor (**sIL6R**)⁸³. Er kann durch alternatives Spleißen oder proteolytische Abtrennung des extrazellulären Anteils des membrangebundenen Proteins entstehen⁸⁴. Wegen der ubiquitären Expression von gp130 ermöglicht es der lösliche Rezeptor auch Zellen, welche die für IL-6 spezifische Alphakette CD126 nicht tragen, Signale durch IL-6 zu empfangen. Dieser Weg wird als *trans signaling* bezeichnet⁸⁴ (**Abbildung 1 rechts**) und ist mit der Aufrechterhaltung chronischer Inflammation und der entzündungsassoziierten Entstehung von Neoplasien^{85,86} assoziiert. Auch in Modellvorstellungen der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen nimmt IL-6 sowie dessen *trans signaling* eine zentrale Rolle ein^{8,25,87}.

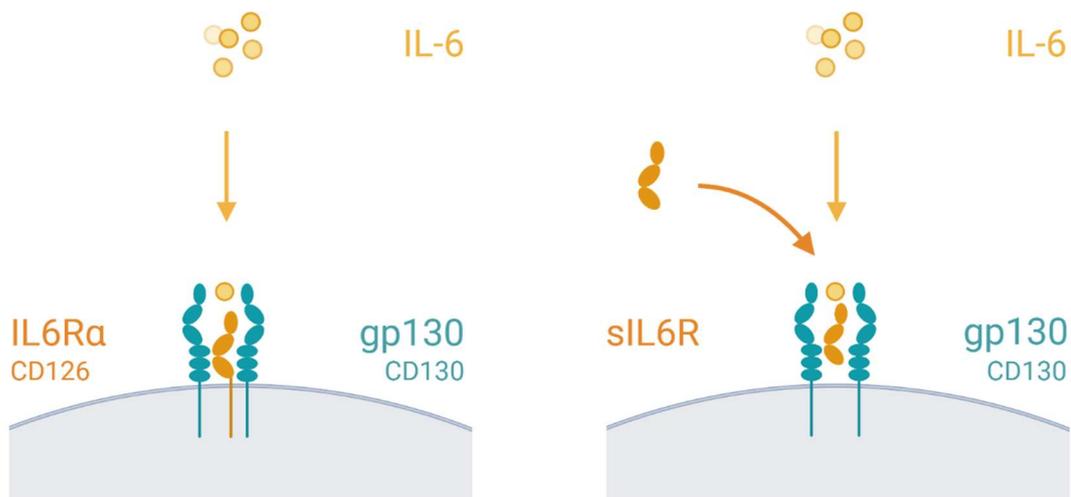


Abbildung 1 – Schematische Darstellung zweier Möglichkeiten zur Rezeption eines IL-6-Signals. Links: Homodimerisierung des Signaltransduktors gp130 zusammen mit dem membrangebundenen, spezifischen Rezeptor für IL-6 (**CD126**). Rechts: Der lösliche IL-6-Rezeptor (**sIL6R**) ermöglicht auch Zellen ohne Expression von CD126 die Rezeption eines Signals durch IL-6. Dies wird als *trans signaling* bezeichnet.

Im Kontext von T-Helfer-Lymphozyten wird $\text{IFN}\gamma$ von Th1-Zellen sezerniert⁵⁵. Es polarisiert Makrophagen in den pro-inflammatorischen M1-Zustand⁴⁸.

Interleukin 10 ist ein anti-inflammatorisches Zytokin, welches in zahlreichen Zelltypen die Produktion pro-inflammatorischer Substanzen inhibiert⁸⁸. T-Helfer-Lymphozyten und Makrophagen, welche IL-10 sezernieren, werden als regulatorisch bezeichnet^{48,55}.

Interleukin 12 wird von antigenpräsentierenden Zellen sezerniert und wirkt polarisierend auf T-Helfer-Lymphozyten in Richtung Th1⁸⁹. Dazu korrelierend werden IL-12 sezernierende Makrophagen dem M1-Zustand zugeordnet^{48,90}. IL-12 ist aus je zwei Untereinheiten p35 (als Dimer p70) und einer Einheit p40 aufgebaut; während p40 auch ein Baustein von IL-23 ist, ist das Homodimer p70 für IL-12 spezifisch⁹¹. Das in dieser Arbeit verwendete Kit weist das Homodimer p70 nach.

2.4 Lysinazetylierung

Die enzymatisch vermittelte Azetylierung von Lysinresten in Proteinen wurde erstmals als kovalente Veränderung von Histonproteinen erkannt und untersucht⁹². Histone bilden die Grundstruktur des Chromatins, indem sich die Desoxyribonukleinsäure (**DNA**) um die Histone herumwickelt (**Abbildung 2**). Die Einheit aus einem Histon-Oktamer, zusammengesetzt aus zwei H2A-H2B- sowie zwei H3-H4-Heterodimeren, und DNA wird als Nukleosom zusammengefasst. Angesichts der Länge des DNA-Moleküls eines Chromosoms resultiert dies in einer außerordentlich kompakten Speicherform, welche Transkriptionseenzymen den Zugang zu Promotor-Regionen und damit die Expression betroffener Gene erschwert⁹². Die Azetylierung bzw. Deazetylierung von Lysin-Resten an den C-terminalen Enden der Histone⁹³ stellt eine

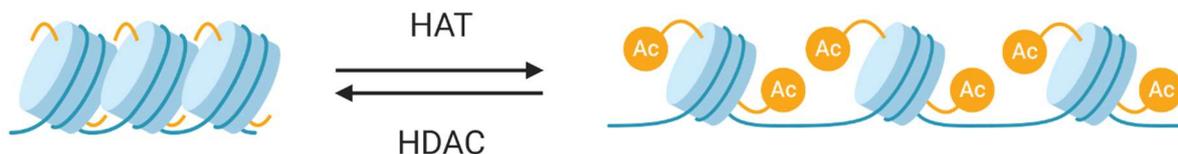


Abbildung 2 – Schematische Darstellung der Chromatinstruktur in kondensiertem (links) und entspanntem (rechts) Zustand, unter anderem vermittelt durch kovalente Azetylierung von Lysinresten an Histonen (blaue Zylinder) **HAT** Histonazetyltransferasen **HDAC** Histondeazetylasen

Möglichkeit dar, die Kompaktheit der Chromatinstruktur punktuell zu beeinflussen: Im nicht-azetylierten Zustand ist die elektrische Nettoladung der C-terminalen Histon-Enden durch die Aminogruppen der Lysinreste positiv; daher bilden diese Wasserstoffbrückenbindungen mit den freien Elektronen des Nukleotidgerüsts der DNA aus⁹⁴. Durch die Azetylierung dieser Lysinreste -- und damit Neutralisierung der Nettoladung - gehen diese Wasserstoffbrückenbindungen verloren; die Interaktion zwischen Histonen und DNA wird weniger eng. Letzterer Zustand wird als „entspanntes“ Chromatin (*relaxed chromatin*, synonym Euchromatin) bezeichnet und

geht mit einem erleichterten Zugang des Transkriptionsapparats zur DNA einher⁹⁵. Abbildung 2 veranschaulicht diesen Zusammenhang.

Die Azetylierung bzw. Deazetylierung der ϵ -Aminogruppe von Lysinen innerhalb von Proteinen wird als post-translationale Modifikation enzymatisch durch KAT bzw. KDAC vermittelt und ist reversibel. Die Identifizierung geeigneter Inhibitoren der KDAC erbrachte einen experimentellen Angriffspunkt, dieses Gleichgewicht zu beeinflussen. Demgegenüber waren derartige Versuche an KAT bislang nicht erfolgreich⁹⁶.

2.4.1 Lysin-deazetylasen und deren Inhibition

Seit der erstmaligen Beschreibung von Histondeazetylasen wurden neben Histonproteinen immer mehr Nicht-Histon-Substrate identifiziert, weshalb die Bezeichnungen Lysin-Azetyltransferasen bzw. -Deazetylasen Konsens fanden⁹⁷. Strukturell können KDAC-Inhibitoren in vier Gruppen eingeteilt werden: Hydroxamsäuren, zyklische Peptide, aliphatische Säuren sowie Benzamide.

Der erste identifizierte Inhibitor Trichostatin A (**TsA**)⁹⁸ gehört zu den Hydroxamsäuren. Als natürlich vorkommendes Produkt von *Streptomyces sp.* war es zunächst als Antimykotikum beschrieben worden⁹⁹. In einer späteren Suche nach Substanzen, welche die Differenzierung von murinen Erythroleukämiezellen anstoßen können, wurde auch TsA untersucht. Es zeigte sich neben einer verstärkten Erythropoese (und damit der gewünschten Differenzierung) ein spezifischer Arrest des Zellzyklus von Rattenfibroblasten in der G1- sowie G2-Phase¹⁰⁰. Die Untersuchung des Wirkmechanismus erbrachte später den Nachweis einer Inhibition von Histondeazetylasen in mehreren Säugetier-Zelllinien⁹⁸.

Der Einfluss von HDAC-Inhibitoren auf den Zellzyklus sowie die epigenetische Modifikation ließ das Interesse an einem Einsatz als antineoplastische Substanzen wachsen. Tatsächlich zeigte sich unter Inhibition von Histondeazetylasen eine vermehrte Apoptose in Tumorzelllinien sowie eine verminderte Inzidenz solider Tumoren in *in-vivo*-Modellen⁹³ bei im Vergleich zu üblichen Zytostatika geringer Toxizität. Ferner zeigte sich ein anti-entzündliches Potenzial in einzelnen Zelllinien¹⁰¹ sowie bei Behandlung humaner mononukleärer Zellen des peripheren Bluts (**PBMC**) vor deren Stimulation mit LPS¹⁰².

2.4.2 Givinostat

Givinostat (syn. ITF2357) ist ein synthetisch hergestellter Vertreter der Hydroxamsäuren (**Abbildung 3**) und ein Inhibitor der KDAC-Klassen I und II¹⁰³. Die Behandlung von humanen PBMC mit Givinostat resultierte in einer verminderten Sekretion von IL-1, IFN γ sowie TNF α ¹⁰² - und offenbarte damit ein starkes anti-inflammatorisches Potenzial in nanomolaren Konzentrationen. Dieser anti-entzündliche Effekt in vitro konnte in einer Phase-I-Studie¹⁰⁴ sowie in einer Phase-II-Studie an Patienten mit juveniler idiopathischer Arthritis¹⁰⁵ bestätigt werden.

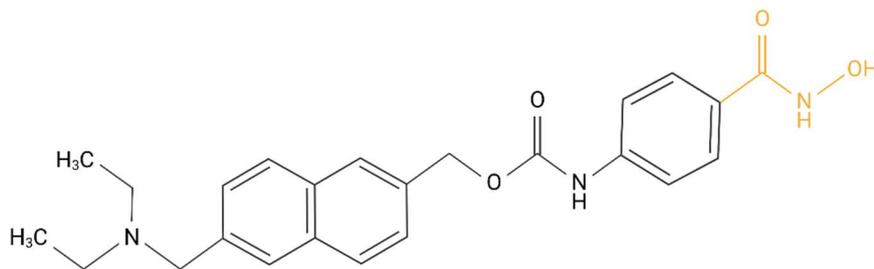


Abbildung 3 – Strukturformel von Givinostat. Die funktionelle Hydroxam-Gruppe ist farblich hervorgehoben. Formel nach [103].

In murinen Kolitismodellen (DSS, TNBS) zeigte sich in vivo eine deutliche, klinische Verbesserung unter Givinostat-Behandlung¹⁰⁶. Vor dem Hintergrund der durch chronische Entzündungen begünstigten Entwicklung von Neoplasien wurde eine weitere in vivo- Untersuchung im AOM-DSS-Modell durchgeführt – es zeigte sich ein vermindertes Auftreten von neoplastischen Veränderungen des Kolons¹⁰⁷.

3 Fragestellung

Makrophagen gehören als Zellen des angeborenen Immunsystems zu den ersten Zellen, die Pathogenen zur Abwehr gegenüberstehen. Vor dem Hintergrund einer angenommenen Barrierestörung bei CED wird ihnen ein Großteil der Verantwortung für die Initiierung und Aufrechterhaltung einer chronischen Entzündung zugeschrieben, letztere insbesondere durch eine Modulation der Antwort von T-Helfer-Lymphozyten im Sinne einer Polarisierung.

Bei Untersuchungen in murinen Kolutismodellen von CED hatte der oral verfügbare Inhibitor von Histondeazetylasen Givinostat eine klinische und histologische Verbesserung des Verlaufs erzielen können. Mit dieser Arbeit soll die Frage beantwortet werden, ob dieser therapeutische Effekt auf eine Modulation der intestinalen Makrophagen zurückzuführen ist und ob dieser Effekt durch eine Polarisierung von Makrophagen durch Givinostat vermittelt sein könnte. Außerdem soll beantwortet werden, ob Givinostat die für die chronische Entzündung so wesentliche Fähigkeit der Antigenpräsentation gegenüber T-Helfer-Lymphozyten sowie die Fähigkeit zur Phagozytose bei Makrophagen verändern kann.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Chemikalien, Lösungen und Kits

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| β -Mercaptoethanol | Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, Deutschland) |
| 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI), $\geq 98\%$ p.a. | Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland) |
| 5,6-Carboxyfluorescein-diacetat- succinimidylester (CFDA-SE , #1351201) | Bio-Rad Laboratories GmbH (Feldkirchen, Deutschland) |
| Acrylamidlösung (30%) | Carl Roth |
| Ammoniumpersulfat ($(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$) | Sigma-Aldrich |
| <i>Anti-FITC MultiSort Kit</i> (130-058-701) inkl. <i>MultiSort Release Reagent und</i> <i>Stop Reagent</i> | Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG (Bergisch Gladbach, Deutschland) |
| Aqua destillata (Aqua dest.) | Fresenius Kabi (Bad Homburg, Deutschland) |
| Bovines Serumalbumin (BSA) | Sigma-Aldrich |
| Bromphenolblau | Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) |
| Cytometric Bead Array (CBA): Mouse Inflammation Kit (552364) | BD Bioscience (San Diego, CA, Vereinigte Staaten) |
| Dimethylsulfoxid (DMSO , wasserfrei) | Sigma Aldrich |
| Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4) | Sigma-Aldrich |
| <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (DMEM) <i>High Glucose</i> | PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich) |
| Dulbeccos phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS, für sterile Anwendungen, sonst als Puffer selbst hergestellt) | PAA |
| ELISA-Kit <i>mouse IL-6 sR</i> (DY1830) | R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN, Vereinigte Staaten) |
| Entwicklungsreagenz für Chemolumineszenz <i>ECL western</i> <i>blotting detection reagents</i> | GE Healthcare GmbH (Solingen, Deutschland) |
| Ethanol (70%) | J. T. Baker (Marke) von Avantor Performance Materials B. V. (Deventer, Niederlande) |
| Fetales bovines Serum (FBS) | LINARIS Biologische Produkte GmbH (Dossenheim, Deutschland) |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Gibco Hank's Balanced Salt Solution, modified</i> (HBSS), calcium- und magnesiumfrei | Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, Vereinigte Staaten) |
| Givinostat (ITF2357) | Italfarmaco S.p.A. (Mailand, Italien) |
| Glycerin | Carl Roth |
| Glycin | Carl Roth |
| Harnstoff | Carl Roth |
| Hühnereialbumin (Ovalbumin, A7641) | Sigma Aldrich |
| Ionomycin (<i>Streptococcus conglobatus</i>) | Sigma Aldrich |
| Kaliumchlorid (KCl) | Sigma-Aldrich |
| Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄) | Sigma-Aldrich |
| L-Glutamin (200 mmol/l, steril) | PAA |
| LPS <i>ultrapure E. coli 011:B4</i> | InvivoGen (San Diego, CA, Vereinigte Staaten) |
| M-CSF, murin, rekombinant (<i>E. coli</i>) | Peprotech |
| Methanol | J. T. Baker (Marke) von Avantor Performance Materials B. V. (Deventer, Niederlande) |
| Milchpulver | Carl Roth |
| N,N'-Methylenbis(acrylamid) (Bisacrylamid) | Carl Roth |
| Natriumchlorid (NaCl) | Sigma-Aldrich |
| Natriumdodecylsulfat (SDS) | Carl Roth |
| Paraformaldehyd | |
| Penicillin | PAA |
| Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) | Sigma Aldrich |
| Phosphorsäure (H ₃ PO ₄) | Sigma Aldrich |
| Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween-20) | Carl Roth |
| Polystyrol-Latexkugeln 2 µm Durchmesser, (Katalognr. L 4530, <i>Latex beads Carboxylate-modified fluorescent yellow-green</i>) | Sigma-Aldrich |
| Propidiumjodid | Sigma Aldrich |
| Ribonuklease A (Katalognr. R6513) | Sigma Aldrich |
| Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 ohne L-Glutamin (E15-039) | PAA |
| Salzsäure (1 mol/l) | Sigma Aldrich |
| Saponin | Sigma Aldrich |

| | |
|-------------------------------------------|---------------|
| Streptomycin | PAA |
| Tetramethylethyldiamin | Sigma Aldrich |
| Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) | Carl Roth |
| Triton X-100 | Merck |

4.1.2 Synthetisches Endopeptid 323-339 des Hühnerovalbumins

Das Peptid der Aminosäuren 323-339 des Hühnerovalbumins wurde vom Institut für Biochemie der Charité synthetisiert und von dort bezogen. Es weist die folgende Aminosäuresequenz auf (vgl. Sequenz des vollständigen Proteins in UniProt-Datenbank¹⁰⁸):

323339
I S Q A V H A A H A E I N E A G R

4.1.3 Puffer, Lösungen und modifizierte Zellkulturmedien

| | |
|------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| CFDA-SE Stocklösung | DMSO, wasserfrei 2 mmol/l f.c. CFDA-SE |
| DNA-Färbepuffer | 1 mg/ml Natriumzitat 0,3 % (V/V) Triton X-100 1 µg/ml Propidiumjodid 20 ng/ml Ribonuclease A + Aqua dest. auf 1 ml |
| Elektrophoresepuffer (10-fach konzentriert) | 144 g Glycin 30 g TRIS 10 g SDS + Aqua dest auf 1 Liter |
| MACS-Puffer | 450 ml PBS 50 ml BSA 5% 2 mmol/l f.c. EDTA |
| Makrophagen-Medium | DMEM High Glucose 2 mmol/l L-Glutamin 1000 U/ml Penicillin 1 mg/ml Streptomycin |
| PBS | 11,5 g Na ₂ HPO ₄ 8 g NaCl 2 g KH ₂ PO ₄ 2 g KCl + Aqua dest. auf 10 Liter |
| PBS-Tween | 2 l PBS 1 ml Tween-20 |
| Probenpuffer | 5 ml Harnstoff (8 M in Aqua dest.) 2 ml Spacer-Puffer 1 ml 20% SDS 500 µl β-Mercaptoethanol 1,5 ml Glycerin |

| | |
|--------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Resolving-Puffer | 60 mg/ml Bromphenolblau 181,5 g TRIS 240 ml Salzsäure (1 M) 260 ml Aqua dest. |
| Sammelgel | 600 µl 30% Acrylamid / 1,5% Bisacrylamid 250 µl Spacer-Puffer 1,5 ml Harnstoff 8 M in Aqua dest. |
| Spacer-Puffer | 75 µl 10% Ammoniumpersulfat 25 µl 10% SDS 2,5 µl Tetramethylethyldiamin 36,6 g TRIS + Aqua dest. auf 500 ml pH mit H ₃ PO ₄ auf 6,7 einstellen |
| <i>Stripping</i> -Puffer | 10 ml 20% SDS 3,085 ml TRIS |
| Transferpuffer | 3,03 g TRIS 14,4 g Glycin 200 ml Methanol + Aqua dest. auf 1 Liter |
| Trenngel | 2,9 ml 25% Acrylamid 2,3 ml Aqua dest. 2,0 ml Resolving-Puffer 100 µl 10% SDS 3,0 ml Harnstoff (8 M in Aqua dest.) 225 µl 3% Ammoniumpersulfat 10 µl Tetramethylethyldiamin |
| T-Zell-Medium | RPMI 1640 10% f.c. FBS 2 mmol/l L-Glutamin 1000 U/ml Penicillin 1 mg/ml Streptomycin |

4.1.4 Antikörper

| Antigen | Herkunft, Subtyp, Klon | Konjugation | Hersteller |
|-------------------------|--------------------------------|--------------|---------------------------------------------------------------------|
| Azetyl-Histon H3 (Lys9) | Kaninchen | (keine) | Cell Signaling Technology Europe B.V. (Frankfurt/Main, Deutschland) |
| CD11b | Ratte, M1/70 | PE | BD Biosciences |
| CD11b | Ratte, M1/70 | APC-Cy7™ | BD Biosciences |
| CD11c | Armenischer Hamster, IgG, N418 | PerCP-Cy5.5™ | eBioscience (inzwischen zugehörig zu Thermo Fisher Scientific) |

| | | | |
|---------------|------------------------------------|-----------------------|---------------------------|
| CD126 | Ratte, IgG2b, D7715A7 | PE | eBioscience |
| CD4 | Ratte, IgG2b, GK1.5 | FITC | BD Biosciences |
| CD4 | Ratte, IgG2b, GK1.5 | FITC | eBioscience |
| CD4 | Ratte, IgG2b, GK1.5 | FITC | Miltenyi |
| CD4 | Ratte, IgG2b, GK1.5 | PE-Cy5™ | eBioscience |
| CD62L | Ratte, IgG2a, | <i>Microbeads</i> | Miltenyi |
| CD80 | Armenischer Hamster, IgG2, 16-10A1 | PE | BD Biosciences |
| CD86 | Ratte, IgG2a, GL1 | FITC | eBioscience |
| F4/80 | Ratte, IgG2a, BM8 | e450™ | eBioscience |
| F4/80 | Ratte, IgG2a, BM8 | PE | eBioscience |
| FITC | | <i>Microbeads</i> | Miltenyi |
| gp130 | Ratte, IgG2a, KGP130 | Alexa647™ | eBioscience |
| IFN γ | Ratte, IgG1, XMG1.2 | FITC | BD Biosciences |
| Kaninchen-IgG | Ziege, IgG, polyklonal | Meerettich-Peroxidase | DAKO (Glostrup, Dänemark) |
| MHC-II | Ratte, M5/114.15.2 | APC | eBioscience |

4.1.5 Geräte

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| Analysewaage <i>BD 210D</i> | Sartorius (Göttingen, Deutschland) |
| Autoklav <i>Varioklav 500 E</i> | H+P Labortechnik (Oberschleißheim, Deutschland) |
| Begasungsbrutschrank Heracell 150 | Heraeus (Hanau, Deutschland), inzw. Thermo Fisher Scientific |
| Binokularmikroskop <i>MBL2000</i> | Krüss (Hamburg, Deutschland) |
| Chemolumineszenzdetektor <i>LAS-4000</i> mit Auswertungssoftware <i>LAS Image Reader</i> (Version 2.1) | Fujifilm (Tokyo, Japan) |
| Durchflusszytometer <i>FACS Canto II</i> mit Software zur Messung <i>FACS Diva</i> (Version 6) | BD Biosciences |
| Eisbereiter <i>AF 100</i> | Scotsman (Bettolino di Poliano, Italien) |
| Kreisschüttler <i>VXR basic Vibrax</i> | IKA-Werke GmbH & Co. KG (Staufen, Deutschland) |
| Kühlschrank (4 °C) <i>Comfort Gastroline</i> | Liebherr (Biberach, Deutschland) |
| Mikrotiterplatten-Photometer <i>spectra mini AP</i> mit Auswertungssoftware <i>Easy Win Fitting</i> | Tecan (Männedorf, Schweiz) |
| Mikrozentrifuge <i>Heraeus Fresco 21</i> | Heraeus |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell</i> (Kammer für Western Blot) - mit Stromversorgung <i>PowerPac Basic Power Supply</i> | Bio-Rad |
| Neubauer-Zählkammer | LO Laboroptik (Bad Homburg, Deutschland; inzwischen Lancing, Vereinigtes Königreich) |
| Pipetten <i>Reference</i> (10, 200, 500, 1000 µl) | Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland) |
| Reagenzglasschüttler <i>Reax 2000</i> | Heidolph Instruments GmbH & Co. KG (Schwabach, Deutschland) |
| Schüttler <i>Vortex Genie 2</i> | Scientific Industries (Bohemia, NY, USA) |
| Sicherheitswerkbank <i>HERAsafe HS 18</i> | Heraeus |
| Software <i>FACS FCAP Array</i> (Version 1) für Auswertung von cytometric bead arrays (CBA) | BD Biosciences |
| Software <i>FlowJo</i> (Version 9.9.4) für Auswertung von Durchflusszytometrie | FlowJo LLC (Ashland, OR, USA), zugehörig zu BD Biosciences |
| Software für Statistik und Datenvisualisierung <i>GraphPad Prism</i> (Version 8) | GraphPad Software, Inc. (San Diego, CA, USA) |
| Taumelrollenmischer RM5 | Labortechnik Fröbel GmbH (Lindau, Deutschland) |
| Taumelrollenmischer <i>The Coulter Mixer</i> | Coulter Electronics (Hertfordshire, Vereinigtes Königreich) |
| Tiefkühlschrank (-20 °C) <i>Premium</i> | Liebherr |
| Tiefkühlschrank (-80 °C) <i>Forma</i> | Thermo Fisher Scientific |
| Wasserbad <i>Isotemp 210</i> | Thermo Fisher Scientific |
| Zentrifuge mit Kühlung <i>5810R</i> | Eppendorf AG |
| 4.1.6 Verbrauchsmaterial | |
| Filterpapier für Western Blots | Schleicher und Schuell (Dassel, Deutschland) |
| Kanülen, sterile Einmalspritzen | B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland) |
| LS-Säulen | Miltenyi |
| Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen | Berthold Technologies GmbH & Co. KG (Bad Wildbad, Deutschland) |
| Mikrozentrifugenröhrchen 5 ml „Eppendorf-Röhrchen“ | Eppendorf AG |
| Pipettenspitzen | Sarstedt AG & Co. (Nürnbrecht, Deutschland) |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|
| Polypropylenröhrchen (50 ml) | Corning Inc. (Corning, NY, USA) |
| Polystyrol-Petrischalen (10 cm Durchmesser) | Corning |
| Polyvinylidenfluorid-Membran <i>Immobilon-P</i> (Porengröße 0,45 µm) für Western Blot | Merck Millipore, Sparte von Merck |
| Protein-Standard <i>page ruler prestained protein ladder</i> | Thermo Fisher Scientific |
| Zellkulturplatten mit 6, 12 oder 48 Vertiefungen | Nunc (Roskilde, Dänemark) |
| Zellschaber | Sarstedt |
| Zellsieb (Nylon, Filtergröße 70 µm) | Corning |

4.1.7 Mäuse

| | |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| C57BL6/J | Wildtyp |
| OT-II | Genetischer Hintergrund des C57BL/6-Stamms mit einem transgenen T-Zell-Rezeptor mit Spezifität für das Endopeptid 323-339 des Hühnerovalbumins |

Die verwendeten Mäuse wurden unter pathogenfreien Bedingungen in der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin am Campus Benjamin Franklin der Charité gehalten. Die Verwendung der Tiere wurde behördlich durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales in Berlin auf Grundlage der Tötungsanzeige T0249/04 "Wirkung von Histondeazetylase-Inhibitoren" genehmigt.

4.2 Methoden

4.2.1 Zellisolation und Zellkultur

Einige Schritte der unten genannten Methoden erfolgten stets unter denselben Bedingungen. Um Redundanzen zu vermeiden, seien diese im Folgenden benannt. Auf hiervon abweichende Bedingungen wird im Text jeweils hingewiesen.

Die **Kultur** aller im folgenden genannten Zellarten erfolgte bei einer Temperatur von 37 °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % und einem 6 %igen Anteil von CO₂ in der Umgebungsluft im Brutschrank.

Die **Zentrifugationsschritte** wurden, soweit nicht anders angegeben, mit einer Beschleunigung von 400 g bei einer Temperatur von 4 °C über sieben Minuten durchgeführt.

Die **Inkubation mit Antikörpern** erfolgte nach dem entsprechenden Einzelprotokoll der Durchflusszytometrie.

4.3 Gewinnung und Isolation von Makrophagen aus murinem Knochenmark

Zur Gewinnung muriner Makrophagen wurden diese durch Differenzierung aus ihren Vorläuferzellen aus dem Knochenmark gewonnen. Diese können von den terminal differenzierten Makrophagen unter anderem durch ihre fehlende Adhärenz an Kunststoffoberflächen unterschieden werden. Dieser Umstand wurde zur Zellseparation ausgenutzt.

4.3.1 Zellisolation

Das Knochenmark wurde aus den Femora und Tibiae unbehandelter Mäuse des C57BL6/J-Stammes gewonnen. Nach Präparation der Röhrenknochen wurde deren Markhöhle mittels einer 26G-Kanüle mit HBSS durchspült. Aus der so gewonnenen Zellsuspension wurde durch mehrmaliges schonendes Resuspendieren durch eine 21G-Kanüle eine Einzelzellsuspension hergestellt und diese anschließend abzentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands wurden die Zellen in Makrophagen-Medium mit 10 ng/ml rekombinantem murinen M-CSF resuspendiert und in einer 6-Loch-Kulturplatte im Brutschrank bei einer Konzentration von 5×10^6 Zellen/ml über Nacht inkubiert. Am darauffolgenden ersten Inkubationstag wurden die nicht-adhärennten Zellen nach vorsichtigem Suspendieren mitsamt dem Überstand in eine nicht-beschichtete Zellkulturschale aus Polystyrol (Durchmesser 10 cm) überführt. Dieser Schritt ermöglicht eine möglichst reine und homogene Population an Vorläuferzellen, da adhärennte Zellen wie Fibroblasten und terminal differenzierte Makrophagen in der 6-Loch-Platte zurückblieben und damit verworfen wurden. Die weitere Inkubation erfolgte über sieben Tage. An den Tagen 3 und 6 wurde das Zellkulturmedium zur Hälfte durch frisches Makrophagen-Medium mit 10 ng/ml rekombinantem murinen M-CSF erneuert.

Am Tag 7 der Inkubation wurden frei flottierende Zellen zusammen mit dem Medium verworfen. Die adhärennten Zellen wurden mit kaltem PBS und einem Zellkulturschaber vorsichtig von der Oberfläche der Petrischale abgelöst, abzentrifugiert und in MACS-Puffer resuspendiert. Zur Sicherstellung des Differenzierungserfolgs wurde eine Probe der Zellen durchflusszytometrisch auf die gleichzeitige Oberflächenexpression von F4/80 und CD11b überprüft. Ein Anteil von mindestens 98 % an F4/80⁺ CD11b⁺ Zellen der gesamten Zellsuspension wurde als notwendig für das weitere experimentelle

Vorgehen festgesetzt. Die so gewonnenen Zellen werden im Folgenden als BMDM bezeichnet.

4.3.2 Zellkultur

Die BMDM wurden in 48-Loch-Platten in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml in Makrophagen-Medium ausplattiert. Givinostat wurde der Zellkultur direkt zu Beginn zugegeben. Die Behandlungsgruppen mit Zugabe von $1 \mu\text{g/ml}$ LPS erhielten diese nach einstündiger Vorbehandlung mit Givinostat, welches weiter in der Zellkultur verblieb. PBS wurde genutzt, um die Zellen nach der Inkubation vorsichtig aus der Vertiefung zu spülen. Anschließend wurden die Zellen den entsprechenden Untersuchungen zugeführt.

4.4 Naive T-Helfer-Lymphozyten mit Spezifität für Ovalbumin

T-Lymphozyten, die das CD4-Antigen auf ihrer Zelloberfläche tragen (T-Helferzellen), sind unerlässlich dafür, die adaptive Immunantwort zu vermitteln. Sie werden als immunnativ bezeichnet, wenn ihr T-Zellrezeptor das für ihn spezifische Antigen noch nie gebunden hat. Solche Zellen exprimieren das Zelladhäsionsmolekül L-Selektin (CD62L) auf ihrer Oberfläche¹⁰⁹, welches ihnen den Eintritt in sekundäre lymphoide Organe und so den Kontakt zu antigenpräsentierenden Zellen ermöglicht.

4.4.1 Zellisolation

Mäusen des C57BL/6-Stamms mit einem transgenen T-Zell-Rezeptor mit Spezifität für das Endopeptid 323-339 des Hühnerovalbumins (**OVA₃₂₃₋₃₃₉**) wurden zur Gewinnung von CD4⁺ T-Lymphozyten die Milz sowie Lymphknoten (*Lnn. cervicales superficiales*, *Lnn. mediastinales*, *Lnn. axillares et brachiales*, *Lnn. lumbales*) entfernt. Die Organe wurden mit dem Stempel einer sterilen 10-ml-Spritze vorsichtig durch ein Zellsieb gedrückt, um die Zellen aus dem Bindegewebe zu lösen. Hiernach wurde die Zellsuspension abzentrifugiert und in MACS-Puffer resuspendiert. Hiernach folgte die magnetaktivierte Zellseparation (s. Abschnitt 4.7), zunächst mit einem Antikörper gegen CD4. Die erhaltene Positivfraktion wurde anschließend erneut nach CD62L separiert und anschließend die doppelpositive Zellfraktion verwendet. Nach Entfernung der *microbeads* erfolgte die durchflusszytometrische Qualitätskontrolle an einer Stichprobe der Zellsuspension: Ein Anteil von 98% an CD4⁺ CD62L⁺ Zellen wurde als notwendig für das weitere Vorgehen festgelegt.

4.4.2 Zellkultur und Proliferationsassay

Die erhaltenen naiven CD4⁺ T-Lymphozyten (T-Lymphozyten) wurden genutzt, um eine mögliche Änderung der mit Givinostat behandelten BMDM hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Antigenpräsentation zu untersuchen. Als Surrogatparameter einer erfolgreichen Antigenpräsentation mit „Aktivierung“ der T-Lymphozyten wurde deren proliferative Antwort festgelegt. Diese wurde durchflusszytometrisch nach Zugabe von Carboxyfluoresceindiacetat-Succinidylester (**CFDA-SE**) bestimmt. Dieses Molekül passiert die Zellmembran der T-Lymphozyten und wird durch zytoplasmatische Esterasen in das fluoreszierende Molekül Carboxyfluoresceinsuccinidylester (**CFSE**) umgewandelt¹¹⁰. Dieses wiederum kann die Zellmembran nicht überwinden und bindet kovalent an Lysinreste intrazellulärer Proteine. Teilt sich eine Zelle, wird der Gehalt an CFSE gleichmäßig auf beide entstehenden Tochterzellen verteilt. Der entsprechende Konzentrationsverlust an CFSE beträgt ca. 50 % und ermöglicht die durchflusszytometrische Unterscheidung der entstehenden Generationen durch die entsprechend geringere Fluoreszenzintensität.

Zunächst wurden die T-Lymphozyten in einer Konzentration von 2×10^7 Zellen/ml in PBS aufgenommen. Es wurde CFDA-SE zu einer finalen Konzentration von 5 $\mu\text{mol/l}$ hinzugefügt. Nach einmaligem Vortexen der Suspension wurde diese über drei Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtabschluss inkubiert und die Inkubation abschließend durch Zugabe des 10-fachen Volumens an FBS-haltigem T-Zell-Medium beendet. Die Zellen wurden abzentrifugiert, erneut mit 10 ml FBS-haltigem T-Zell-Medium resuspendiert und abermals abzentrifugiert.

Es wurden $2,5 \times 10^5$ Zellen in T-Zell-Medium resuspendiert und zusammen mit $1,25 \times 10^5$ BMDM (vorbehandelt mit Givinostat in einer Konzentration von 0, 50, 100 oder 150 nmol/l) in jeweils eine Vertiefung einer 48-Loch-Platte überführt. OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid wurde der Kokultur in einer finalen Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ zugegeben. Das Gesamtvolumen betrug 1 ml je Vertiefung der Kulturplatte. Nach einer Kulturdauer von drei Tagen wurden die Zellsuspension entnommen und zentrifugiert. Die Kulturüberstände wurden bei -80°C für spätere Messungen der Zytokinkonzentrationen eingefroren. Das Zellpellet wurde in 100 μl MACS-Puffer resuspendiert und anschließend durchflusszytometrisch hinsichtlich der Fluoreszenz analysiert.

4.4.3 Nachweis intrazellulärer Zytokine

Zusätzlich zur Auswertung der proliferativen Antwort der T-Lymphozyten wurden bei mehreren Untersuchungen auch die Zytokine IL-4 und IFN γ intrazellulär mit Antikörpern angefärbt und durchflusszytometrisch gemessen. Es wurde sich am Vorgehen nach Foster et. al.¹¹¹ orientiert, der Ablauf wird im Folgenden knapp zusammengefasst.

Am Tag 5 der Kokultur von BMDM und T-Lymphozyten erfolgte eine Restimulierung der T-Lymphozyten mit 20 ng/ml Phorbol-12-myristat-13-acetat (**PMA**) sowie 1 μ mol/l Ionomycin. An Tag 7 wurde die Zellkultur beendet, die Zellen wurden durch Legen der Zellkulturplatte auf Eis und mehrfaches Spülen mit -4 °C kaltem PBS vorsichtig gelöst. Die Zellen wurden in einer 4 %igen Paraformaldehyd-Lösung in PBS fixiert und nach 5 Minuten Einwirkzeit bei Raumtemperatur anschließend mit MACS-Puffer gewaschen. Das intrazelluläre Kompartiment wurden den Antikörpern durch Permeabilisierung mit 0,5% Saponin in MACS-Puffer über eine Einwirkzeit von 25 Minuten bei Raumtemperatur zugänglich gemacht; dieser Schritt ersetzte den Inkubationsschritt mit Antikörpern aus dem Durchflusszytometrie-Protokoll. Anschließend wurden die Zellen zunächst mit 0,5% Saponin in MACS-Puffer und anschließend zweimalig mit MACS-Puffer gewaschen. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Messung.

4.5 Messung der Phagozytose

Zur Messung der Phagozytose-Aktivität von Makrophagen wurden unbehandelte Latexkügelchen mit enthaltenem Fluorochrom (Exzitation 470 nm, Emission 505 nm) mit einem Durchmesser von 2 μ m genutzt. Die Latexkügelchen erfuhren keine weitere Behandlung, wie zum Beispiel eine Opsonisierung. Das Vorgehen erfolgte nach STEWART, LEHNERT UND STEINKAMP¹¹² und wird hier kurz zusammengefasst: Nach Ihrer Gewinnung (Abschnitt 4.3.1) wurden Makrophagen auf 10^6 Zellen / ml in MACS-Puffer eingestellt und 3 ml dieser Zellsuspension in ein 50 ml Polypropylen-Röhrchen pipettiert. Die Latexkügelchen wurden auf eine Partikelkonzentration von 3×10^8 / ml eingestellt und 3 ml dieser Suspension in das Polypropylenröhrchen hinzugegeben. Es erfolgte die Inkubation bei 37 °C auf einem Taumelmischroller über 60 Minuten. Anschließend wurden die Zellen einem Zentrifugationsschritt und der Resuspension mit 1 ml MACS-Puffer unterzogen und anschließend durchflusszytometrisch gemessen.

Da nicht-opsonisierte Partikel weniger stark phagozytiert werden¹¹³ wurden Polystyrol-Partikel mit Carboxylat-Modifikation gewählt; sie werden im Vergleich zu unmodifizierten Partikeln stärker aufgenommen¹¹⁴ – was ermöglichte, die Versuchslänge auf 60 Minuten zu begrenzen. Da der Versuch unter serumfreien Bedingungen stattfand um Opsonine auszuschließen, war diese zeitliche Begrenzung für die Erhaltung der Vitalität der Makrophagen relevant.

Die Auswertungsgröße wurde berechnet als Aktivitätsindex, welcher sich als Produkt aus der Anzahl der im Histogramm stark FITC-fluoreszierenden Zellen (Positivfraktion) sowie der Anzahl der pro Zelle aufgenommenen Latexkügelchen ergab. Die letztere Kennzahl wurde errechnet, indem die geometrisch gemittelte Fluoreszenzintensität der Positivfraktion durch die mittlere Fluoreszenzintensität der Latexkügelchen selbst dividiert wurde. Aufgrund der breiten Streuung der phagozytotischen Aktivität unter Kontrollbedingungen (ohne vorherige Givinostat-Inkubation) zwischen den einzelnen Versuchsreihen, wurden deren Aktivitätsindex auf 100% normalisiert und die Aktivitätsindizes der Vergleichsgruppen als Prozentsatz von diesem angegeben.

4.6 Proteinnachweis mit Western Blot

4.6.1 Prinzip

Mit dem Western Blot können Proteine in einer Probe nachgewiesen werden. Hierzu werden die Proteine der Probe nach ihrer Molekülgröße aufgetrennt und anschließend auf eine Membran übertragen. Auf dieser erfolgt die Detektion mittels spezifischem (primärem) Antikörper sowie der Nachweis durch einen Enzym-gekoppelten sekundären Antikörper durch Chemolumineszenz.

4.6.2 Durchführung

Untersucht wurden Zelllysate der Makrophagen. Die Zellen wurden in Probenpuffer aufgenommen und vor ihrer Untersuchung zur vollständigen Denaturierung der Proteine für 5 min auf 95 °C erhitzt.

Um die Proteine nur ihrer Größe und nicht ihrer Ladung nach aufzutrennen, wurde eine SDS-Gelelektrophorese nach dem Prinzip von LAEMMLI¹¹⁵ durchgeführt. Dabei lagert sich das negativ geladene Natriumdodecylsulfat (**SDS**) an die Proteine direkt proportional zu ihrer Molekülgröße an. Sämtliche Proteine weisen hierdurch eine vergleichbare Ladung auf - die Laufgeschwindigkeit wird nun allein durch die Molekülgröße bestimmt.

Es wurde eine Gelplatte aus Trenngel (oben) und Sammelgel (unten) gegossen. In der oberen Kante des Sammelgels wurden Taschen für die jeweiligen Proben ausgespart. Die Proben wurden mit Probenpuffer zu je 20 µl Gesamtvolumen in die Taschen gegeben. Eine Tasche wurde zur Kontrolle mit einer Lösung von Proteinen mit standardisierten Molekülgrößen beladen. Die Gelplatte wurde in Elektrophoresepuffer positioniert. Die Elektrophorese wurde über 60 min bei 200 V durchgeführt.

Die aufgetrennten Proteine wurden aus der Gelplatte heraus auf eine proteinbindende Membran durch eine weitere Elektrophorese transferiert. Genutzt wurde eine Polyvinylidenfluorid (**PVDF**)-Membran. Diese wurde zunächst über 1 min in Methanol inkubiert. Anschließend wurden die Membran, die Schwämmchen sowie die Filterpapiere für 10 min in Transferpuffer inkubiert. Anschließend erfolgte der Einbau in die Transferkammer in der folgenden Reihenfolge: (Kathodenseite) – Schwämmchen – Filterpapier – Gelplatte aus der Elektrophorese – PVDF-Membran – Filterpapier – Schwämmchen – (Anodenseite). Der Transfer erfolgte durch Anlegen eines elektrischen Feldes mit einer konstanten Stromstärke von 250 mA über 55 min. Während des Transfers wurde die Transferkammer mit Eis gekühlt. Nach dem Transfer wurde die PVDF-Membran mit 10 ml PBS/Tween dreimal gewaschen. Auch bei allen weiteren Waschsritten erfolgte dies dreimal.

Zur Blockierung freier Proteinbindungsstellen der PVDF-Membran wurde diese für zwei Stunden in 10 ml PBS/Tween mit 5 % Milchpulver in einem Schälchen auf einem Kreisschüttler inkubiert. Nach einem Waschsritt wurde die Membran mit einer 1:1000-Verdünnung des primären Antikörpers in 5 ml PBS/Tween über Nacht bei 4 °C in einem Zentrifugenröhrchen auf einem Taumelrollenmischer inkubiert. Anschließend erfolgten ein weiterer Waschsritt sowie die Inkubation mit dem sekundären, enzymgekoppelten Antikörper. Dieser wurde in 10 ml PBS/Tween in einer Verdünnung von 1:2000 eingesetzt. Die Inkubation erfolgte über eine Stunde bei Raumtemperatur in einem Schälchen auf einem Kreisschüttler, gefolgt von einem weiteren Waschsritt. Das Substrat für das Antikörper-gekoppelte Enzym wurde als proprietäres Entwicklungsreagenz zu 1 ml für eine Minute auf die Membran gegeben. Anschließend erfolgte die Aufnahme der Chemolumineszenz, als Belichtungszeit wurden 15 sec gewählt.

4.6.3 Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest

Der enzymgekoppelte Immunadsorptionstest (**ELISA**) dient als Nachweisverfahren von Proteinen in einer Lösung und deren Konzentrationsbestimmung durch Vergleich mit Proben mit bekannter Konzentration des interessierenden Proteins.

Dabei werden die Böden einer Reaktionsplatte mit 96 Vertiefungen mit einem spezifischen Antikörper beschichtet. Nach Auftrag der Probe wird das interessierende Protein von diesen primären Antikörpern gebunden. Das so gefangene Protein wird in einem zweiten Schritt durch lösliche Antikörper gleicher Spezifität gebunden, an denen ein Enzym zur Sichtbarmachung durch Farbreaktion gebunden ist. Die Farbintensität entspricht der Menge des enzymatisch umgesetzten Substrates und erlaubt durch Interpolation zwischen Positivproben mit bekannten Konzentrationen des Substrats eine Konzentrationsbestimmung der Proben¹¹⁶.

Genutzt wurde ein proprietäres Kit zum Nachweis von sIL6R. Alle Arbeitsschritte wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

4.7 Magnetaktivierte Zellseparation

Prinzip

Das Verfahren der magnetaktivierten Zellseparation (**MACS**) ermöglicht die Isolation von Zellen durch magnetische Kräfte. Zellen werden durch spezifische Antikörper markiert, welche an Dextran-umhüllte Nanosphären mit einem Kern aus Eisen(II,III)-oxid (*microbeads*) konjugiert sind. Nach der Markierung wird das aufzutrennende Zellgemisch als Suspension in eine mit Stahlwolle ausgekleidete Säule verbracht und um diese ein Magnetfeld hoher Feldstärke (0,6 T) angelegt. Die Säule wird mehrmals nur mit Hilfe der Schwerkraft mit MACS-Pufferlösung durchspült. Am Ende kann die angereicherte Zellfraktion der Säule durch Elution entnommen werden, nachdem diese aus dem Magnetfeld herausgenommen worden ist. Zur Verbesserung der Reinheit des gewonnenen Zellisolats kann dieses unmittelbar im Anschluss über eine weitere Separationssäule gegeben werden. Durch enzymatische Abspaltung der *microbead*-konjugierten Antikörper sind auch mehrstufige Separationsprotokolle nach mehreren Antigenen durchführbar. Hierzu wird die Suspension aus Zellen und frei flottierenden *microbeads* erneut über eine Separationssäule laufen gelassen. Die dabei aufgefangene Suspension besteht dann (fast) nur noch aus den Zellen im Medium; die *microbeads* werden durch die Magnetkräfte in der Säule zurückgehalten.

Durchführung

Die Inkubation der Zellen mit den Antikörper-beschichteten *microbeads* erfolgte über 15 Minuten unter Lichtabschluss bei 6 °C in einem Verhältnis von 4 µl *microbead*-Antikörper-Suspension auf ein Gesamtvolumen von 100 µl Zellsuspension (10^8 Zellen/ml). Die Inkubation wurde durch Zugabe des zehnfachen Volumens an MACS-Puffer gestoppt und die Zellsuspension zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde einmal wiederholt.

Die LS-Säule des Kits wurde mit insgesamt 3 ml MACS-Puffer gespült. Anschließend wurde die Zellsuspension (10^8 Zellen in 500 µl MACS-Puffer) aufgetragen und langsam mit insgesamt 3 ml MACS-Puffer durch die Säule gespült. Die aufgefangene Zellsuspension (Negativfraktion) wurde verworfen. Nach Auftragen von 5 ml MACS-Puffer wurde dieser mittels eines mitgelieferten Stempels mit Kraft durch die Säule gespült. Die aufgefangene Zellsuspension stellte die Positivfraktion dar und wurde weiterverwendet.

Zuletzt wurden die *microbead*-konjugierten Antikörper durch Zugabe von 20 µl einer proprietären *Release*-Lösung auf 1 ml Zellsuspension entfernt. Nach einer zehnmütigen Inkubation unter Lichtabschluss bei 6 °C wurde die Suspension auf eine Separationssäule gegeben und wie zuvor mit 3 ml MACS-Puffer langsam durch die Säule gespült. Die erhaltene Zellsuspension wurde weiterverwendet.

4.8 Durchflusszytometrie

Prinzip

Das Verfahren ermöglicht die Charakterisierung von Zellen hinsichtlich ihrer Größe, ihrer Granularität und unter Zuhilfenahme fluoreszenzmarkierter Antikörper auch hinsichtlich ihrer Proteinexpression. Die zu untersuchende Suspension wird derart durch die Flusszelle eines Durchflusszytometers geleitet, dass diese von einzelnen Zellen sequenziell passiert wird. Hier werden sie von einem Laserstrahl getroffen, welcher durch ihre charakteristischen Eigenschaften gestreut wird. Im kleinen Winkel erfährt der Lichtstrahl eine zur Zellgröße proportionale Ablenkung, welche als *forward scatter* (**FSC**) bezeichnet und durch einen Detektor in direkter Linie mit dem Lichtstrahl quantifiziert wird. Die Ablenkung des Lichtstrahls im größeren Winkel ist auf die Granularität sowie die Beschaffenheit der Zellmembran und des Zellkerns zurückzuführen und zur Ausprägung dieser als optische Komplexität

zusammengefassten Eigenschaften proportional. Ein Detektor im rechten Winkel zum Lichtstrahl quantifiziert diesen *sideward scatter* (**SSC**).

Zur Charakterisierung des Antigenmusters von Zellen wurden diese zuvor mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern markiert. Die Fluorochrome werden durch den Laserstrahl zur Emission von Lichtquanten angeregt, welche durch weitere Detektoren gemessen werden. Dabei muss sichergestellt werden, dass zur Anregung der verwendeten Fluorochrome Laser der geeigneten Wellenlänge eingesetzt werden. Unter Berücksichtigung der Emissionsspektren zeitgleich verwendeter Fluorochrome ist es möglich, durch den Detektoren vorgeschaltete Wellenlängenfilter jeweils die Emission nur eines Fluorochroms zu messen. So können die Zellen bei nur einer Untersuchung hinsichtlich der Expression mehrerer Antigene charakterisiert werden.

Statt Zellen können auch unbelebte korpuskulare Bestandteile einer Suspension untersucht werden, wie z. B. beim Verfahren der zytometrischen Messung von Zytokinkonzentrationen (Abschnitt 4.9).

Konfiguration des Durchflusszytometers

Abbildung 4 zeigt schematisch den optischen Aufbau des Durchflusszytometers auf.

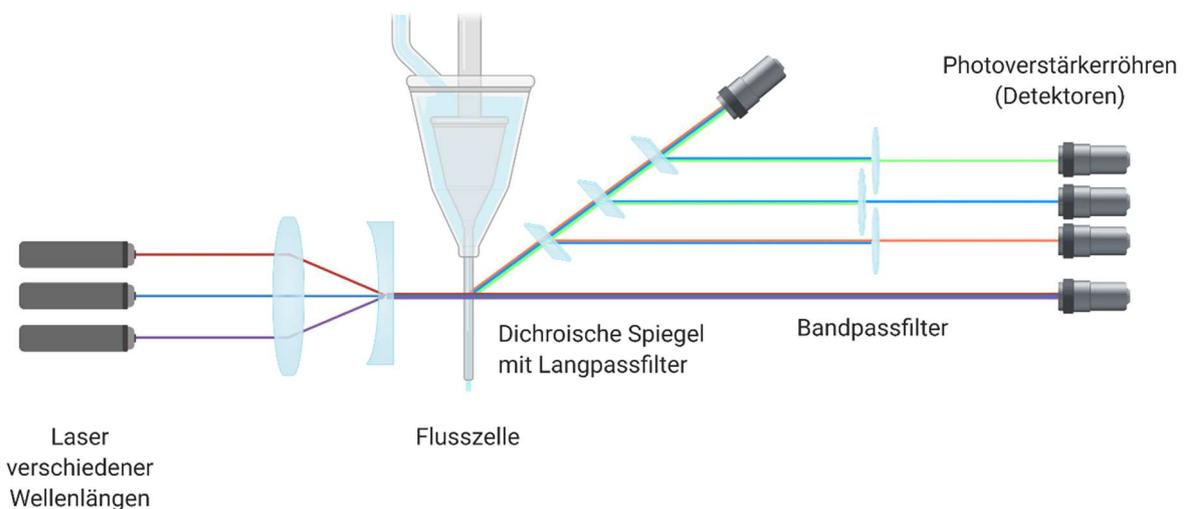


Abbildung 4 – Schema des optischen Aufbaus eines Durchflusszytometers. Die Lichtbündel von Lasern verschiedener Wellenlängen werden in der Flusszelle fokussiert. Dichroische Spiegel und Bandpassfilter ermöglichen den Einsatz zahlreicher Photoverstärkerröhren und damit der multidimensionalen Erfassung mehrerer Exzitationsspektren von Fluorochromen.

Die konkrete genutzte Konfiguration der optischen Elemente für die Untersuchungen dieser Arbeit sind in **Tabelle 1** angegeben.

Tabelle 1 – Konfiguration der Detektionsfilter im eingesetzten Durchflusszytometer. Für den roten und violetten Laser stehen jeweils zwei Detektoren, für den blauen Laser bis zu fünf Detektoren verfügbar. Die Detektoren werden als Platzbezeichner entsprechend der Bedienungsanleitung des FACS Canto II als A-H angegeben. Langpässe werden mit ihrer Cut-off-Wellenlänge in Nanometer angegeben. Bandpässe werden durch ihre Zentralwellenlänge und Halbwertsbreite getrennt durch einen Schrägstrich notiert, jeweils in Nanometern.

| Laser | Detektor | Spiegel | Filter |
|------------------|----------|---------|--------|
| Blau (488 nm) | A | 735 | 780/60 |
| | B | 655 | 670 |
| | D | 556 | 585/32 |
| | E | 502 | 530/30 |
| | | | |
| Rot (633 nm) | A | 735 | 780/60 |
| | C | (kein) | 660/20 |
| Violett (405 nm) | A | 502 | 510/50 |
| | B | (kein) | 450/50 |

Inkubation mit Antikörpern

Nach Herstellen einer Einzelzellsuspension mit einer Konzentration von $2-4 \times 10^5$ Zellen je μl in MACS-Puffer wurde diese mit den jeweils gewählten Antikörpern unter Lichtabschluss für zehn Minuten bei 4°C inkubiert. Die Inkubation wurde durch Zugabe von MACS-Puffer beendet und die Zellsuspension abzentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen; das Zellpellet wurde in $50 \mu\text{l}$ MACS-Puffer resuspendiert und innerhalb von zwei Stunden nach der Färbung der durchflusszytometrischen Untersuchung zugeführt.

Durchführung und Datenauswertung

Die durchflusszytometrische Untersuchung wurde an einem FACS Canto II mit Hilfe der FACS Diva Software (beide BD Biosciences) durchgeführt. Die anschließende Auswertung der Messdaten erfolgte mit der Software FlowJo (FlowJo LLC, USA).

4.8.1 Bestimmung der Zellvitalität

Um sicherzustellen, dass die durchflusszytometrische Messung der Expression oberflächlicher Antigene nur an vitalen Zellen durchgeführt wurde, mussten entsprechend die nicht-vitalen (apoptotischen oder nekrotischen Zellen) von der Analyse ausgeschlossen werden. Zunächst wurden nur erfasste Events innerhalb eines bestimmten Fensters (*gate*) von Größe (FSC) und Granularität/Komplexität (SSC) zugelassen; dieses wurde als „Zellgate“ definiert. Bestandteil jeder Färbung war Propidiumjodid (**PI**). Dieser Farbstoff ist nur in der Lage, die Zellmembran toter Zellen - nicht jedoch die vitaler Zellen - zu passieren und dort in Doppelstränge der DNA zu interkalieren. Daher wurden mit PI gefärbte Zellen („PI_{pos}“) als nicht vital von der Bestimmung der Antigenexpression ausgeschlossen.

Das Produkt des Anteils von Ereignissen im Zellgate x PI_{neg} Zellen wurde als Vitalität erfasst und als solche im Ergebnisteil angegeben. Auf diese Weise wurden sowohl Zelltrümmer (außerhalb des Zellgates) als auch die mit PI angefärbten, toten Zellen zur Bestimmung der Letalität der Zellen in der Kultur herangezogen.

4.8.2 Identifizierung apoptotischer DNA-Fragmente

Zur differenzierten Erfassung auch derjenigen apoptotischen Zellen, deren Zellmembran zum Zeitpunkt der Messung noch nicht permeabel für PI waren, wurde eine DNA-Färbung durchgeführt. Noch vor Zusammenbruch der Barriere der Zellmembran beginnt in apoptotischen Zellen der enzymatische Abbau der DNA zu kleinen Fragmenten¹¹⁷. Da kürzere DNA-Fragmente eine deutlich geringe Oberfläche zum Interkalieren von PI bieten, zeigen sie sich im Histogramm deutlich getrennt von dem „Hügel“ der Fluoreszenzintensität von Zellen mit normalen DNA-Längen.

Maximal 1¹⁰ Zellen werden in ein 50 ml Polypropylen-Röchen gegeben und bei 250 g und 4 °C für fünf Minuten zentrifugiert; alle weiteren Zentrifugationsschritte weisen in diesem Protokoll diese Parameter auf. Der Überstand wird abpipettiert, anschließend wird das Zellpellet tropfenweise in 1 ml 70 %igem Ethanol (vorgekühlt auf -20 °C) aufgenommen. Die Färbung wurde nach einem weiteren Zentrifugationsschritt nach Abpipettieren des Überstands und Aufnahme des Zellpellets in 1 ml DNA-Färbepuffer über 15 Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt. Anschließendes Waschen mit MACS-Puffer und Resuspension in 100 µl MACS-Puffer für die Durchführung der durchflusszytometrischen Messung.

4.9 Durchflusszytometrische Messung löslicher Zytokine

Prinzip

Dieses Verfahren stellt eine Erweiterung der Durchflusszytometrie dar und ermöglicht die gleichzeitige Konzentrationsbestimmung mehrerer löslicher Proteine aus einer Probe (Multiplex-Assay). Kernbestandteil sind sogenannte *capture beads*, 7,5 µm durchmessende Mikrosphären, welche mit einem Primärantikörper gegen das interessierende Protein beschichtet sind. Für jede Spezifität wird eine eigene Gruppe an *beads* eingesetzt, die eine jeweils charakteristische Fluoreszenz aufweist. Nach Inkubation mit der Probe werden für die einzelnen Proteine spezifische Detektionsantikörper hinzugegeben, die durch Konjugation mit Phycoerythrin (**PE**) eine starke Fluoreszenz aufweisen. Proteine, die durch die Antikörper an der

Oberfläche der *beads* festgehalten werden, werden durch die Inkubation mit den Detektionsantikörpern fluoreszenzmarkiert. Die Fluoreszenz der Komplexe ist hierdurch proportional zur Menge des gebundenen Proteins. Mittels einer Standardreihe mit bekannten Konzentrationen der interessierenden Proteine können deren Konzentrationen in den Proben durch Regressionsanalyse absolut quantifiziert werden.

Vorbereitung der Proben

Nach Abschluss der Zellkultur wurde nach behutsamer Durchmischung des Überstandes etwa die Hälfte dessen vorsichtig aus den Kulturgefäßen entnommen und zur Entfernung versehentlich aufgenommenener frei flottierender Zellen zentrifugiert. Das gegebenenfalls verbliebene Pellet wurde verworfen. Die Proben wurden für die spätere Messung der Zytokinkonzentrationen bei -20 °C bis zur Durchführung gelagert. Zur Messung wurden die Proben entsprechend der erwarteten Zytokinkonzentrationen entweder unverdünnt oder 1:100 eingesetzt.

Durchführung

Es wurde ein proprietäres Kit von BD Biosciences benutzt und alle Schritte entsprechend den Herstellerangaben ausgeführt. Die dem Kit beiliegenden *capture beads* (Mikrosphären mit Fangantikörpern) der einzelnen Spezifitäten wurden gepoolt und je $50\text{ }\mu\text{l}$ der Suspension in FACS-Röhrchen gegeben. Diesen wurden $50\text{ }\mu\text{l}$ der (gegebenenfalls mit *assay diluent* verdünnten) Proben bzw. Standardproben sowie $50\text{ }\mu\text{l}$ der Mischung aus PE-konjugierten Detektionsantikörpern hinzugefügt. Nach gründlicher Durchmischung der einzelnen Suspensionen wurden diese über zwei Stunden unter Lichtabschluss bei Raumtemperatur inkubiert. Die Inkubation wurde durch Zugabe von 1 ml beiliegenden Waschpuffers gestoppt und die Suspensionen für fünf Minuten bei 200 g zentrifugiert. Die Überstände wurden vorsichtig abpipettiert und verworfen. Der feste Rückstand aus Mikrosphären wurde gründlich in $300\text{ }\mu\text{l}$ Waschpuffer resuspendiert und innerhalb einer Stunde am Durchflusszytometer gemessen. Die Messung erfolgte am FACS Canto™, die Auswertung mit der Software FCAP Array™ (beide BD Biosciences).

4.10 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mittels der Software GraphPad Prism.

Mittelwerte von Messwerten der einzelnen Behandlungsgruppen (Givinostat-Konzentrationen) wurden durch einfache Varianzanalyse und nachgeschaltetem Dunnett-Test für Mehrfachvergleiche gegenüber der Kontrollgruppe (ohne Givinostat) auf signifikante Unterschiede getestet. Bei einem p-Wert von unter 0,05 wurde eine statistische Signifikanz angenommen.

Im Ergebnisteil werden, soweit nicht anders angegeben, die Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwerts aufgeführt.

5 Ergebnisse

5.1 Unveränderte Vitalität muriner Makrophagen unter niedrigen Givinostat-Konzentrationen

Um die höchste einzusetzende Konzentration von Givinostat für die Vorbehandlung der BMDM festlegen zu können, wurden diese mit Konzentrationen bis zu 500 nmol/l über 24 Stunden unter Standardbedingungen inkubiert. Lichtmikroskopisch zeigten sich die Zellen bis zu einer Konzentration von 200 nmol/l unauffällig, über 200 nmol/l hinaus stellten sich die Zellen zunehmend runder, mit deutlich weniger Zellausläufern dar und zeigten damit lichtmikroskopische Anzeichen einer Apoptose.

Zur Quantifizierung der Apoptose wurden die BMDM durchflusszytometrisch analysiert. Anhand einer Probe unbehandelter BMDM wurde die Erwartungsgrößen hinsichtlich der Größe sowie der Granularität vitaler Zellen festgelegt („Zellgate“). Den Zellsuspensionen der behandelten BMDM wurde Propidiumjodid (PI) zugegeben, um avitale Zellen mit permeabler Zellmembran zu detektieren. In Übereinstimmung mit den lichtmikroskopischen Befunden zeigte sich eine konstante Vitalität der BMDM bis zu einer Konzentration von maximal 200 nmol/l (**Tabelle 2**).

Dieser Darstellung würden jedoch Zellen entgehen, welche sich gerade in der Apoptose befinden, deren Zellmembran jedoch noch intakt - und damit impermeabel für PI wäre. Im Zuge der Apoptose kommt es zu einem Abbau der DNA in kleinere Fragmente¹¹⁷. Durch die Fragmente sinkt die Gesamtoberfläche zur Interkalierung von PI und hierdurch die Fluoreszenzintensität der einzelnen Zelle.

In Übereinstimmung mit den anderen genutzten Methoden zeigte sich ein sprunghafter Anstieg der Zellen mit niedriger PI-Fluoreszenz ab einer Givinostat-Konzentration von 500 nmol/l (**Tabelle 2**). Für die folgenden Experimente wurde daher die Konzentration von 200 nmol/l als Maximaldosis für die Behandlung der BMDM mit Givinostat gewählt.

Tabelle 2 – Einfluss der Inkubation muriner Makrophagen mit Givinostat über 24 Stunden auf deren Vitalität. Durchflusszytometrische Daten der Ereignisse der PI-negativen Ereignisse im Zellgate sowie des Anteils der Zellen mit vermindertem DNA-Gehalt (sub-G0/G1). Mittelwert (SD), * p < 0,05 gegenüber Kontrolle ohne Givinostat (0 nmol/l).

| Wert | Konzentration von Givinostat [nmol/l] | | | | | |
|--------------------|---------------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|------------------|
| | 0 | 50 | 100 | 150 | 200 | 500 |
| % Zellgate | 65,5 (7,2) | 61,2 (7,1) | 66,1 (6,9) | 63,9 (8,0) | 65,6 (6,1) | 72,6 (20,4) |
| % PI-negativ | 88,8 (6,4) | 84,2 (11,9) | 84,7 (12,5) | 81,6 (17,1) | 85,2 (6,6) | 39,3 (2,4)* |
| % Vitalität | 58 (10) | 52 (10) | 56 (10) | 52 (10) | 56 (10) | 29 (0,9)* |
| % sub-G0/1 | 5,6 | 5,2 | 1,5 | 3,6 | 6,6 | 33,4* |

5.2 Wirknachweis der Hyperazetylierung

Zunächst war die Hyperazetylierung von Histonen als erwartete Wirkung von Givinostat an den murinen Makrophagen nachzuweisen. Bei Inhibitoren der KDAC-Klasse I, damit auch Paninhibitoren wie Givinostat einschließend, wird dieser üblicherweise durch Nachweis eines erhöhten Anteils an azetyliertem Lysin 9 von Histon 3 erbracht. Zelllysate der behandelten BMDM wurden durch Western-Blot auf den Gehalt an Histon 3, an Lysinrest 9 azetyliertem Histon 3 (**acH3**) und β -Actin (Kontrolle) hin semiquantitativ untersucht. Die acH3-Bande zeigte sich in Abhängigkeit der Givinostat-Konzentration dichter. Die Banden von β -Actin und Histon 3 zeigten sich erwartungsgemäß konstant (**Abbildung 5**).

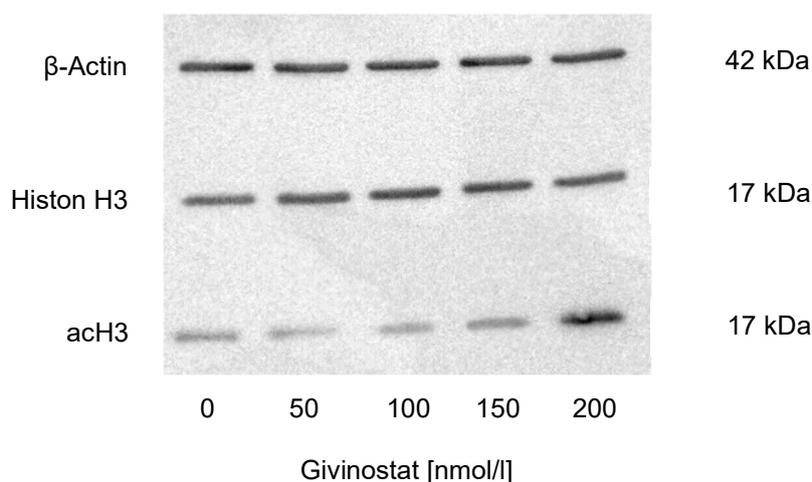


Abbildung 5 – Azetylierung von Histon H3. Aufnahme der Photolumineszenz eines Western Blots zur Darstellung des Gehalts an Histon H3 in Makrophagen, welches an Lysinrest 9 azetyliert ist (acH3). Zur Kontrolle mitbestimmt wurden β -Actin und Histon H3.

5.3 Modulation des Immunphänotyps muriner Makrophagen

Der Mannoserezeptor (CD206) zeigte eine Steigerung seiner Expression in der Gruppe mit der maximal gewählten Konzentration an Givinostat von 200 nmol/l auf das 1,16-fache ($\pm 0,05$, $n = 8$) gegenüber der Kontrollgruppe ohne Givinostat ($1,00 \pm 0,01$, $n = 8$). Die Expression von Integrin αX (CD11c) zeigte sich in dieser Gruppe lediglich tendenziell erhöht ($1,21 \pm 0,07$, $n = 6$), dies war jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied. Unverändert in ihrer Expression zeigten sich Integrin αX , die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86, MHC-II sowie die Moleküle des IL-6-Rezeptorkomplexes CD126 und CD130 (**Abbildung 6**, weiße Balken).

Makrophagen treten *in vivo* ihren Aufgaben entsprechend mit bakteriellen Antigenen in Kontakt. Zur Klärung, ob Givinostat einen Einfluss auf den Immunphänotyp auch in Anwesenheit eines starken bakteriellen Stimulus hat, wurden dieselben Messungen in Anwesenheit von LPS durchgeführt. Bei Zugabe von 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS nach der Inkubation mit Givinostat zeigten die Oberflächenmoleküle eine andere Modulation. Die Expressionen von CD206, CD11c und CD86 waren in den unterschiedlichen Gruppen unverändert. Die Expression von CD80 schien zwar bereits bei niedrigen Konzentrationen von Givinostat eine erhöhte Expression zu zeigen (1,22-fach ab 50 nmol/l), diese Veränderung erreichte jedoch keine statistische Signifikanz (**Abbildung 6**, graue Balken).

Die Expression von MHC-II war in der LPS-exponierten Gruppe in Abhängigkeit der Givinostat-Konzentration deutlich erhöht. Sie stieg auf das 2,2-fache bei 150 nmol/l Givinostat. Auch die Bestandteile des IL-6-Rezeptorkomplexes CD126 und CD130 zeigten sich verändert. Die nach LPS-Exposition beobachtete Expressionssteigerung auf das 3,55-fache ($\pm 0,21$, $n = 5$) bzw. 1,21-fache ($\pm 0,11$, $n = 5$) war bei vorheriger Inkubation mit Givinostat deutlich vermindert. Während sich die Mittelwerte der Givinostat-inkubierten Gruppen hinsichtlich der CD130-Expression nicht weiter unterschieden, zeigte sich CD126 in Abhängigkeit der Givinostat-Konzentration zunehmend stark supprimiert (**Abbildung 6**, graue Balken).

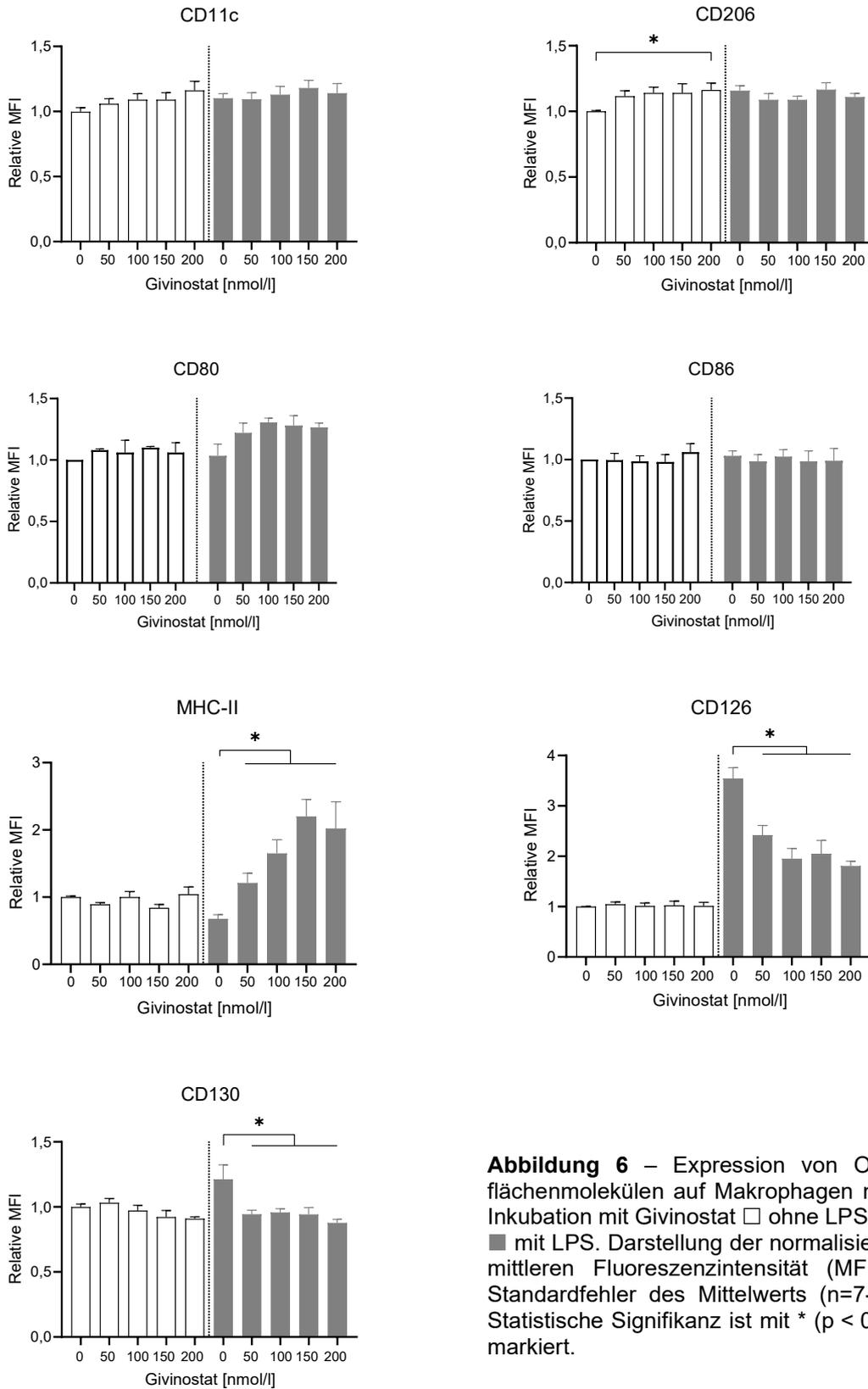


Abbildung 6 – Expression von Oberflächenmolekülen auf Makrophagen nach Inkubation mit Givinostat □ ohne LPS und ■ mit LPS. Darstellung der normalisierten mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) ± Standardfehler des Mittelwerts (n=7-12). Statistische Signifikanz ist mit * (p < 0,05) markiert.

5.4 Veränderung des Zytokinprofils der Makrophagen

Das Zytokinprofil der Makrophagen aus der Kontrollgruppe ohne Givinostat-Inkubation zeigte sich gemäß den Erwartungen: Die dominierenden Zytokine waren $\text{TNF}\alpha$ und IL-6 sowie das Chemokin CCL2. Die Zellen sezernierten geringe Mengen IL-10 und fast vernachlässigbare Mengen an IL-12p70 (**Abbildung 7**).

Die Sekretion von $\text{TNF}\alpha$ zeigte auch unter zunehmenden Konzentrationen von Givinostat keine Änderung. Hingegen war die Sekretion von IL-6 halbiert, die von IL-10 verringerte sich auf ein Viertel. Die bereits sehr niedrige Konzentration von IL-12p70 verminderte sich an den Rand der experimentellen Nachweisgrenze des gewählten Verfahrens (**Abbildung 7**).

Der Verlauf der Konzentrationswerte von CCL2 zeigte eine Abhängigkeit zu Givinostat. Im Bereich von 50-100 nmol/l war die CCL2-Konzentration geringer (75% des Ausgangswertes), bei der höchsten gewählten Givinostat-Konzentration betrug sie das 1,5-fache (**Abbildung 7**).

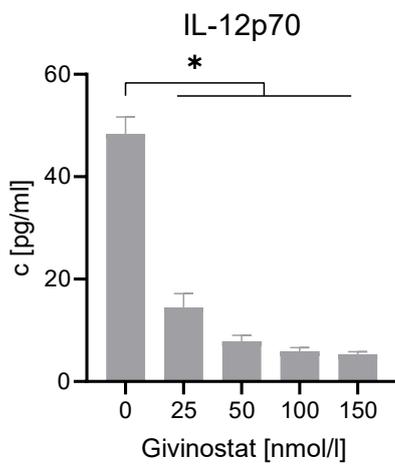
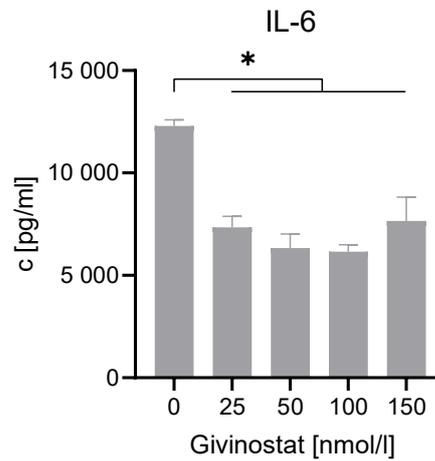
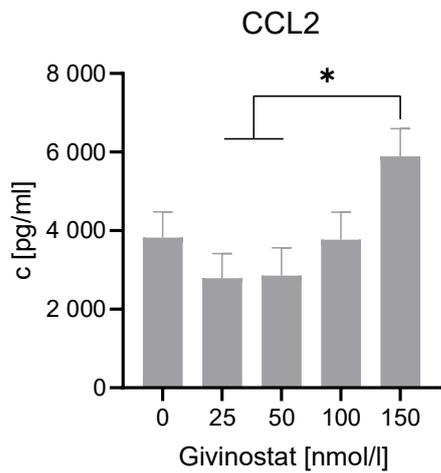
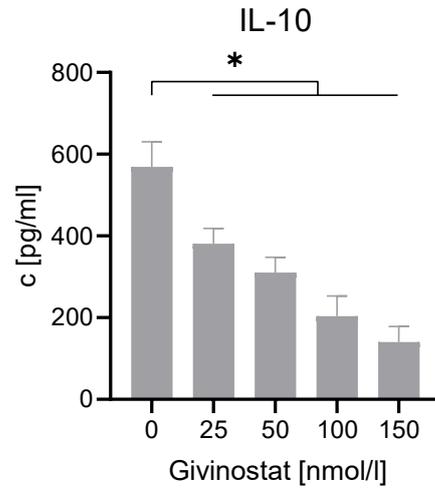
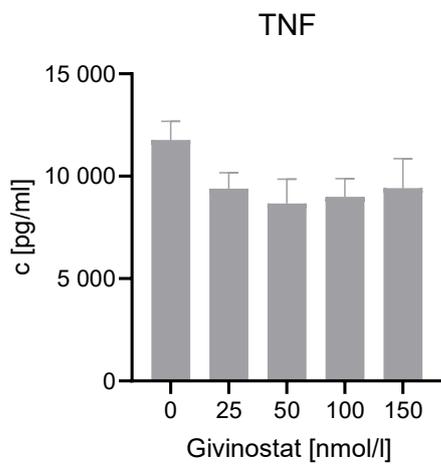


Abbildung 7 – Modulation des Zytokinprofils nach einstündiger Inkubation von Makrophagen mit Givinostat, gefolgt von einer 24-stündigen Inkubation mit LPS. Darstellung der gemessenen Konzentrationen \pm Standardfehler des Mittelwerts (n=6). Statistische Signifikanz ist mit * ($p < 0,05$) markiert.

5.5 Verminderte Fähigkeit zur Aktivierung von CD4⁺ T-Lymphozyten

Die beobachtete Expressionssteigerung von MHC-II auf Makrophagen, die in Anwesenheit von LPS und Givinostat inkubiert waren, ließ die Frage nach der funktionellen Auswirkung auf die Fähigkeit zur Antigenpräsentation stellen. Diese wurde als proliferative T-Zellantwort nach Präsentation eines spezifischen Antigens durch die Givinostat-behandelten BMDM an CD4⁺ CD62L⁺ T-Lymphozyten mit Spezifität für OVA₃₂₃₋₃₂₉ gemessen.

Die Exposition der BMDM mit Givinostat bei gleichzeitiger Inkubation mit dem Antigen führte dazu, dass die proliferative T-Zell-Antwort vermindert ausfiel. Unter Givinostat blieb der Anteil der nicht proliferierten CD4⁺ T-Lymphozyten mit 51,5% ($\pm 3,6$, n=8) bzw. 69,4% ($\pm 0,9$, n=4) (100, 200 nmol/l) signifikant höher als mit 42,9% ($\pm 1,4$, n=8) Kontrollgruppe (**Abbildung 8**). Dabei zeigten sich die Ergebnisse davon unabhängig, ob die BMDM während der Inkubation mit dem Antigen auch LPS gegenüber ausgesetzt waren (drei Experimente ohne signifikanten Unterschied zu den Gruppen ohne LPS; keine eigene Abbildung).

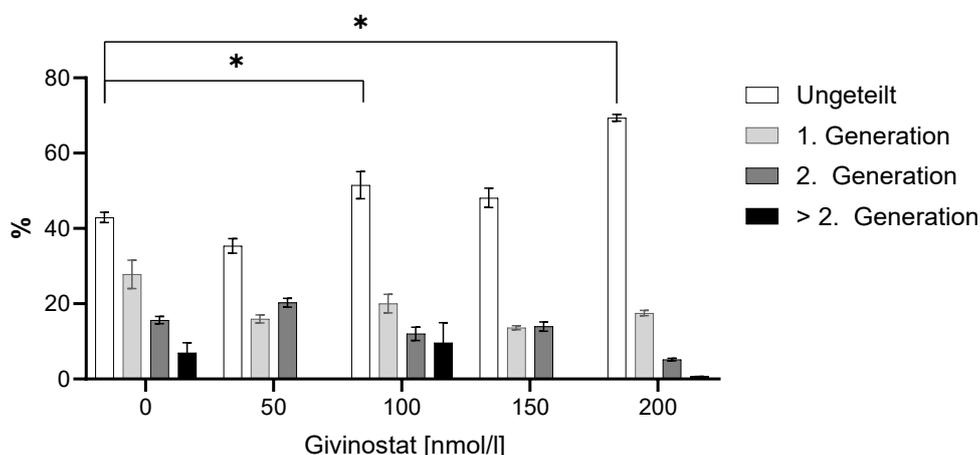


Abbildung 8 – Verminderung der proliferativen antigenspezifischen T-Helferzell-Antwort nach Präsentation von OVA-Peptid durch zuvor mit Givinostat inkubierte Makrophagen. Darstellung des Mittelwerts \pm Standardfehler (n = 4-8). Statistische Signifikanz ist mit * ($p < 0,05$) markiert.

Die bisherigen Versuche waren mit OVA₃₂₃₋₃₂₉ durchgeführt worden. Es wurden drei parallele Untersuchungsreihen mit vollständigem Hühneralbumin durchgeführt; zu den Ergebnissen mit OVA₃₂₃₋₃₂₉ zeigte sich kein Unterschied (keine eigene Abbildung).

Es stellte sich die Frage, ob die Veränderung der proliferativen T-Zell-Antwort mit einer veränderten Ausschüttung von Zytokinen einhergeht. In Übereinstimmung zur verminderten Proliferation der CD4⁺ T-Lymphozyten ein Rückgang der Konzentration von Interferon γ in den Zellkulturüberständen (**Abbildung 9a**).

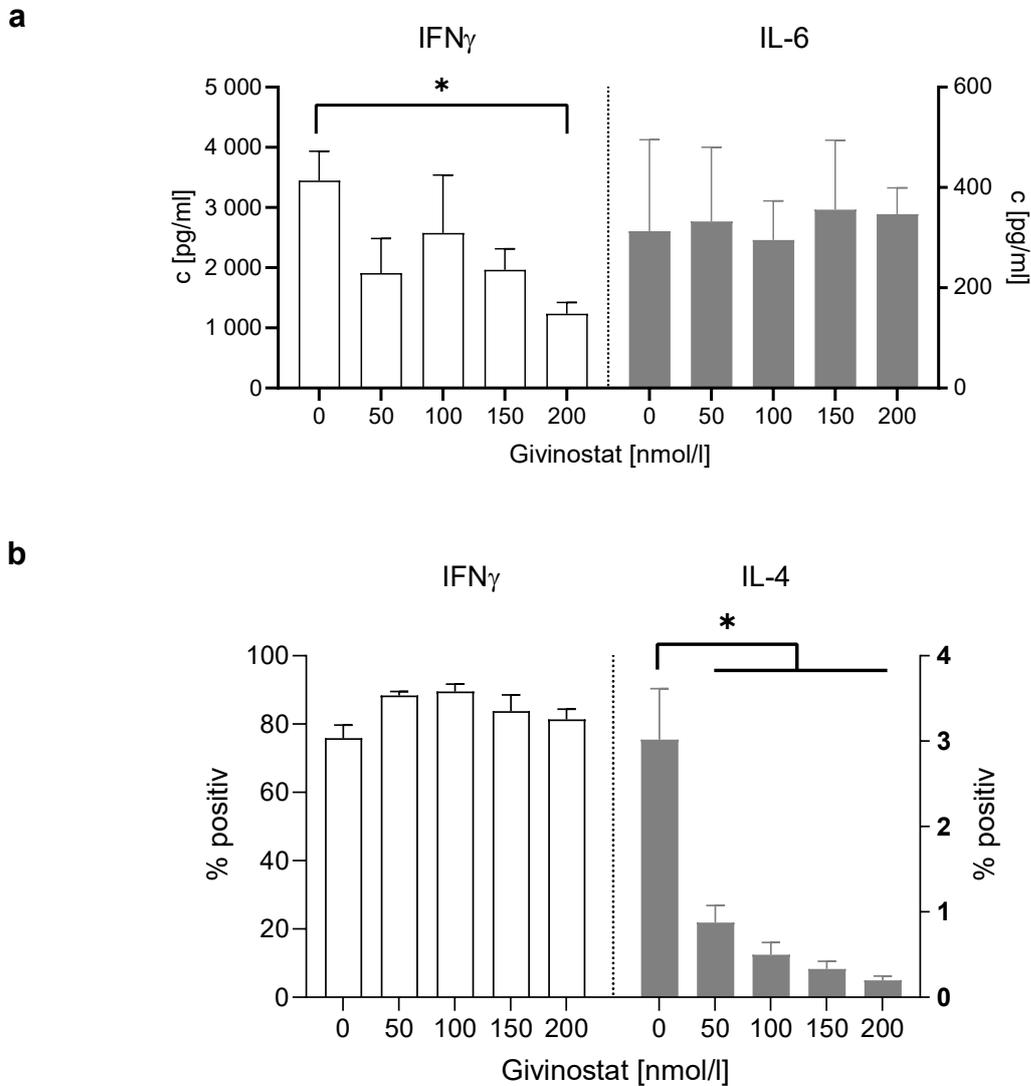


Abbildung 9 – **a** Konzentrationen von Interferon γ und Interleukin 4 in Überständen der Kokultur von CD4⁺ T-Lymphozyten und zuvor mit Givinostat und dem spezifischen Antigen inkubierten Makrophagen. **b** Anteil der CD4⁺ T-Lymphozyten mit durchflusszytometrischem Nachweis von intrazellulärem Interferon γ und Interleukin 4 nach vorheriger Fixierung. Gleiche Kulturbedingungen wie (**a**). Jeweils Darstellung des Mittelwerts \pm Standardfehler (n = 4). Statistische Signifikanz ist mit * ($p < 0,05$) markiert.

Um subtile Veränderungen des Zytokinprofils der CD4⁺ T-Lymphozyten zu untersuchen, wurden die T-Zellen nach der Kokultur mit den BMDM fixiert und eine intrazelluläre Markierung der produzierten Zytokine (IFN γ und IL-4) durchgeführt. Hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied des Anteils an IFN γ -produzierenden Lymphozyten. Hingegen war der – ohnehin marginale – Anteil an IL-4-produzierenden

T-Lymphozyten in denjenigen Gruppen nochmals niedriger, die das Antigen von den Givinostat-exponierten Makrophagen präsentiert bekommen hatten (**Abbildung 9b**).

5.6 Verminderte Phagozytose von Latexmikrokügelchen durch Makrophagen

Die deutlich verminderte Antigenpräsentation durch die Givinostat-inkubierten Makrophagen ließ die Frage nach einer möglichen Auswirkung von Givinostat auf die phagozytotische Aufnahme von Partikeln durch die Makrophagen aufkommen. Eine verminderte Phagozytose könnte die Anzahl präsentierter Antigene vermindern und so eine T-Zellantwort a priori abschwächen. Makrophagen wurden mit fluoreszierenden Latexkügelchen inkubiert, deren Fluoreszenzintensität zur durchflusszytometrischen Messung genutzt wurde. Die Phagozytoseaktivität der Kontrollgruppe wurde auf 100% normalisiert, mittels Einstichproben-t-Test gegen 100% wurde auf einen statistisch signifikanten Unterschied getestet.

Nach einer Inkubation mit 200 nmol/l Givinostat zeigten Makrophagen eine Phagozytoseaktivität von 69,1% ($\pm 8,65$, n=4) der Kontrollgruppe. Die Vergleichsgruppe mit einer Givinostat-Konzentration von 100 nmol/l zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe.

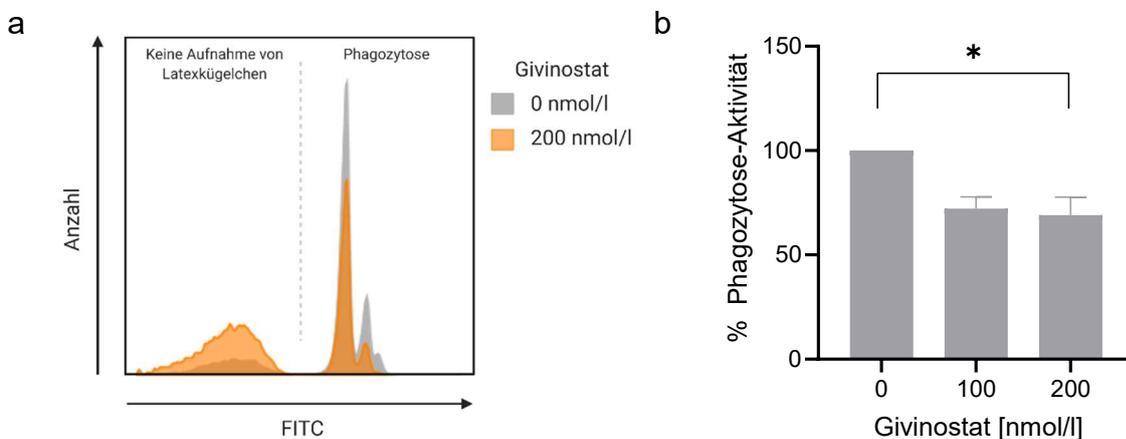


Abbildung 10 – **a** Beispielhaftes Histogramm der Fluoreszenzintensitäten im FITC-Kanal für zwei Proben von Makrophagenpopulationen nach einstündiger Inkubation mit Givinostat in unterschiedlichen Konzentrationen. **b** Verringerung der phagozytotischen Aufnahme fluoreszierender Latexkügelchen durch murine Makrophagen nach einstündiger Inkubation mit Givinostat. Darstellung des prozentualen Aktivitätswertes gegenüber dem Ausgangswert der unbehandelten Vergleichsgruppe \pm Standardfehler des Mittelwerts (n=6). Statistische Signifikanz wird mit * ($p < 0,05$) markiert. (n = 4)

5.7 Verminderte Sekretion des löslichen IL-6-Rezeptors durch Makrophagen

Angesichts der deutlichen Modulation des IL-6-Signalweges der Makrophagen auf Rezeptor- und Zytokinebene durch Givinostat sollte im nächsten Schritt dessen

Einfluss auf die Sekretion von sIL6R unter den Bedingungen der Kokultur mit antigenspezifischen CD4-T-Lymphozyten nach Zugabe von Ovalbumin untersucht werden.

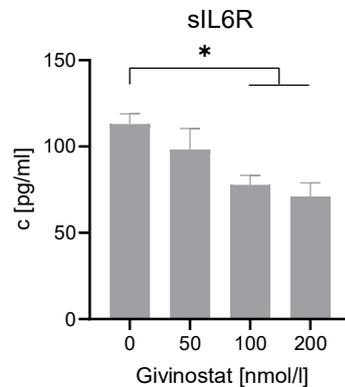


Abbildung 11 – Verringerung der Konzentration des löslichen IL-6-Rezeptors (sIL6R) in Überständen der Zellkulturen muriner Makrophagen nach einstündiger Inkubation mit Givinostat. Mittelwert der gemessenen Konzentrationen \pm Standardfehler des Mittelwerts (n=6). Statistische Signifikanz wird mit * ($p < 0,05$) markiert. (n = 5)

Tatsächlich zeigte sich die Sekretion von sIL6R in Abhängigkeit der Konzentration von Givinostat während der Vorbehandlung der Makrophagen vermindert (**Abbildung 11**), von 113 pg/ml der Kontrollgruppe zu 77,8 pg/ml ($\pm 5,48$, 100 nmol/l, n=5) bzw. 71,0 pg/ml ($\pm 7,89$, 200 nmol/l, n=5).

6 Diskussion

6.1 Einordnung der eingesetzten Konzentration von Givinostat

Die meisten Vordaten zur *in-vitro*-Toxizität von Givinostat lagen aus Studien mit humanen und murinen Zelllinien vor. Eine Zelltoxizität zeigte sich zwischen 300 nmol/l bei humanen Zelllinien von Multiplem Myelom und akuter myeloischer Leukämie¹¹⁸ und 500 nmol/l an einer humanen Leberzellkarzinom-Zelllinie¹¹⁹. Bei humanen PBMC war ab 300 nmol/l eine erste Erhöhung der Apoptoserate gemessen worden¹⁰². Die Ergebnisse dieser Arbeit zur Toxizität von Givinostat bei murinen BMDM zeigten ebenfalls einen deutlichen Anstieg der Apoptose ab einer Konzentration von 500 nmol/l.

Die Wirksamkeit von Givinostat als Inhibitor von HDAC in niedrig-nanomolaren Konzentrationen bis 200 nmol/l konnte durch Darstellung der konzentrations-abhängigen Hyperazetylierung von Histon 3 nachgewiesen werden.

Die *in-vivo*-Studien im murinen DSS- sowie im TNBS-Modell der Kolitis, in denen sich der protektive Effekt der oralen Gabe von Givinostat gezeigt hatte und die den Anlass für die vorgelegte Arbeit gab, verwendete eine orale Dosis von täglich 10 mg/kg¹⁰⁷. Nach der Konversionsformel

$$D_{human} = D_{murin} \frac{K_{m,murin}}{K_{m,human}} \quad [120]$$

entspricht dies einer Dosis von 0,8 mg/kg im Menschen ($K_{m,murin} = 3$, $K_{m,human} = 37$,¹²⁰) und damit einer oralen Tagesdosis von etwa 60 mg. Eine klinische Phase-I-Studie zu Givinostat gab bei einer einmaligen Einnahme von 50 mg maximale Plasmakonzentrationen von 111 nmol/l an. Dieselbe Studie stellt eine effektive Tagesdosierung bei Erwachsenen von 2 x 100 mg in Aussicht, bei der sich im Gleichgewichtszustand Plasmakonzentrationen von 65 nmol/l (Talspiegel) bis 380 nmol/l (Maximalspiegel) einstellten¹⁰⁴. Die in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen von Givinostat zur Inkubation der Makrophagen umfassen diese Wertebereiche. Einschränkend sind die tatsächlich lokal erreichten Konzentrationen von Givinostat in der intestinalen Mukosa nicht bekannt.

6.2 Die phänotypische und funktionelle Modulation muriner Makrophagen durch Givinostat verdeutlicht den kontinuierlichen Übergang von M1/M2-Polarisierungszuständen

Die klinisch bereits etablierte, erfolgreiche Blockade des hauptsächlich von Makrophagen produzierten $\text{TNF}\alpha$ zeigt beispielhaft deren wichtige Rolle in der Pathogenese der CED. Untersuchungen erbrachten Hinweise darauf, dass die anti-inflammatorische Wirkung nicht allein auf der Blockade des Zytokin-Signals beruht, sondern zudem eine regulatorische Antwort gefördert wird: Es wurde sowohl *in vitro*¹²¹ als auch *in vivo*¹²² die Fähigkeit von Infliximab gezeigt, regulatorische Makrophagen zu induzieren. Als Wirkmechanismus wird die Bindung von Infliximab (wie auch von Certolizumab) an Fc-Rezeptoren auf der Oberfläche von Makrophagen angenommen¹²¹. Die Entwicklung dieser Population an regulatorischen Makrophagen war zudem mit dem klinischen Ansprechen auf Infliximab korreliert¹²². Es wird also nicht nur die inflammatorische Antwort von Makrophagen unterbunden, als auch aktiv deren anti-inflammatorisches (M2-) Potenzial genutzt. Dies unterstreicht das große Potenzial von Makrophagen als zellulärem Angriffspunkt in der Therapie von CED. Eine Frage dieser Arbeit ist es, ob die Inkubation muriner Makrophagen mit Givinostat geeignet ist, sie in Richtung eines M2-Zustands zu polarisieren.

Die vorliegende Arbeit zeigte die Expressionserhöhung des Mannoserezeptors (CD206) auf der Zelloberfläche muriner Makrophagen durch Givinostat. Die quantitativ recht geringe Expressionssteigerung steht dabei in Übereinstimmung mit Daten der mRNA-Expression von *in vitro* durch IL-4 induzierten M2-Makrophagen¹²³. CD206 ist ein etablierter Marker für M2-Makrophagen^{48,64}. Die Rolle von Integrin αX (CD11c) zur Beschreibung des Polarisierungszustands wird widersprüchlich angegeben. Die CD11c⁺ Fraktion gewebesresidenter Makrophagen im Fettgewebe adipöser Mäuse unter fettreicher Diät¹²⁴ zeigte eine erhöhte mRNA-Expression von $\text{TNF}\alpha$ und induzierbarer NO-Synthase als die CD11c⁻ Fraktion, exprimierte jedoch ebenso typische M2-Marker wie den Mannoserezeptor als auch Ym1, Arg-1 und Fizz-1. Humane intestinale Makrophagen, welche nicht pro-inflammatorisch auf geeignete Stimuli reagieren¹²⁵, weisen zudem keine Expression von CD11c auf^{79,125}. Hingegen existieren proteomische Daten, welche *in vitro* eine Expressionssteigerung von CD11c bei murinen M(IL-4) zeigten¹²⁶; hier gehörte es zusammen mit Integrin β -2 zu den M2-spezifisch expressionsgesteigerten Genen. Beide Proteine bilden zusammen den

Komplementrezeptor CR4, welcher die Phagozytose von Komplement-markierten Partikeln wie z. B. apoptotischen Zellen befördert¹²⁷ – ein funktionales Kriterium für eine M2-Zuordnung¹²⁸. Dies lässt eher den Schluss zu, dass im Fall der Beobachtungen im murinen Fettgewebe CD11c als Teil der M2-typischen Moleküle vermehrt exprimiert wurde, die Zellen jedoch von ihm unabhängig ein pro-inflammatorisches Zytokinprofil aufweisen. CD11c wird im Kontext der vorliegenden Arbeit als M2-Marker interpretiert.

Givinostat hatte einen steigernden Effekt auf die LPS-induzierte Expressionssteigerung von MHC-II auf Makrophagen. Ein solcher Effekt ist auch bei der Inkubation von Makrophagen mit IL-4 beschrieben worden¹²⁹ – dies entspricht letztlich der Polarisierung zum M(IL-4)-Subtyp und damit dem anti-inflammatorischen Extrem des M1/M2-Spektrummodells⁶⁴. Bei einer verstärkten Expression von MHC-II wäre eine erhöhte Fähigkeit zur Antigenpräsentation und damit Aktivierung von CD4⁺ T-Lymphozyten denkbar. Diese Folgerung erwies sich hier jedoch als nicht zutreffend. Givinostat zeigte einen verringernden Effekt auf die Fähigkeit der Makrophagen zur Antigenpräsentation – im Gegensatz zu den Beobachtungen der Oberflächenantigene CD206 und CD11c war dieser Effekt von der An- und Abwesenheit von LPS nicht beeinflusst.

Ein ähnlicher Effekt einer HDAC-Inhibition mit dem Klasse I/IV-Inhibitor Mocetinostat im Sinne einer vermehrten Expression von MHC-I und MHC-II war in Zelllinien des nichtkleinzelligen Lungenkarzinoms beschrieben worden¹³⁰; daraus folgend wurde eine vermehrte Fähigkeit zur Antigenpräsentation und somit einer verstärkten Angreifbarkeit der Tumorzellen gegenüber CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten erhofft. Jedoch wurden auch die inhibitorischen Membranmoleküle PD-L1 und PD-1 vermehrt exprimiert, so dass die verstärkte Immunantwort gegen inokulierte Tumorzellen *in vivo* die Kombination mit einem antagonistischen Antikörper gegen PD-L1 benötigte¹³⁰. Die Expression dieser Moleküle wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht – bietet aber einen Ansatzpunkt, die Ursache des paradoxen Effekts zu untersuchen.

Es fiel auf, dass die LPS-inkubierte Gruppe ohne Vorinkubation mit Givinostat keine Expressionssteigerung gegenüber den Makrophagen ohne LPS-Exposition zeigte. Die Expression von MHC-II wird auch im Rahmen einer inflammatorischen Antwort auf antigenpräsentierenden Zellen erhöht, sowohl im Rahmen einer IFN γ -vermittelten Steigerung der Genexpression¹³¹, als auch durch die Mobilisierung von MHC-II von

Endo- und Lysosomen in das Membrankompartiment⁵⁴. Nach einem TLR4-Stimulus produzieren Makrophagen zwar auch IFN γ , allerdings in niedriger Menge und nur intrazellulär autokrin wirksam¹³². Diese niedrige Expression ist augenscheinlich nicht geeignet, die stark erhöhte MHC-II-Expression des M(IFN γ ,LPS)-Subtyps⁶⁴ zu induzieren.

Untersuchungen, bei denen die CD4-T-Lymphozyten anders als in der vorliegenden Arbeit direkt mit Givinostat inkubiert wurden, zeigten nach Aktivierung mittels Concanavalin A in den Kulturüberständen weniger IFN γ , aber eine gleichbleibende Konzentration von IL-4¹³³ im Vergleich zu den Kontrollen – was einer Polarisierung in Richtung Th2-Zustand entspricht⁸⁸. Makrophagen tragen durch freie und membrangebundene Zytokine zur Polarisierung von T-Lymphozyten bei. Es wurde gezeigt, dass die proliferative CD4⁺ T-Zell-Antwort durch Givinostat-exponierte Makrophagen vermindert war; ebenso war die Gesamtmenge des sezernierten IFN γ parallel zum Abfall der proliferativen Antwort vermindert – der Anteil der IFN γ ⁺ CD4⁺ T-Lymphozyten blieb jedoch konstant. Zusammen mit dem verringerten Anteil der IL-4⁺ CD4⁺ T-Lymphozyten an der Gesamtzahl der aktivierten T-Lymphozyten erscheint damit eine Th2-Polarisierung unterdrückt zu werden. Eine Modulation der Makrophagen durch Givinostat in Richtung eines M2-Zustands konnte die CD4⁺ T-Zell-Antwort also nicht in dieselbe Richtung verändern.

6.3 Relevanz der beobachteten verminderten Phagozytose

Die Phagozytoseaktivität der Makrophagen wurde mittels 2 μ m durchmessender carboxylatmodifizierter Latexkügelchen gemessen, welche vor der Zugabe nicht opsonisiert oder anderweitig mit molekularen Erkennungssignalen (z. B. Phosphatidylserin wie bei apoptotischen Zellen) versehen wurden. Die Aufnahme eines solchen Partikels wird zu 60%¹³⁴ durch eher unspezifische Bindung mittels der drei Mustererkennungsrezeptoren (*scavenger receptors*) SR-AI, SR-AII sowie MARCO angestoßen. Die Aufnahme lebender und toter Bakterien, apoptotischer Zellen oder xenobiotischer Partikel wie der Latexkügelchen werden allesamt durch diese Rezeptoren vermittelt, wenn serumfreie Bedingungen vorliegen¹³⁵.

Hier wurde eine verminderte Phagozytose von Polystyrol-Latexkügelchen durch diejenigen Makrophagen festgestellt, welche gegenüber Givinostat exponiert gewesen waren, bevor sie mit LPS stimuliert wurden. Die oben genannten Rezeptoren werden

unter M1/M2-Bedingungen unterschiedlich reguliert: SR-AI und -AII werden konstitutiv auf Makrophagen exprimiert und zeigen kaum eine Änderung durch Einflüsse der Mikroumgebung, MARCO hingegen wird erst unter M1-Bedingungen (z. B. LPS-Exposition) nennenswert und durch IL-4 vermindert exprimiert¹³⁴ – damit ist eine verminderte Aufnahme nicht-opsonisierter Partikel unter M2-Bedingungen zu erwarten. Ein Effekt einer ähnlich stark verminderten Phagozytose von Latexkügelchen wurde durch IL-4 in peritonealen Makrophagen des gleichen Mausstamms (C57BL/6) beschrieben¹³⁴. Ebenso wurde eine vermehrte Aufnahme von carboxylatmodifizierten Polystyrol-Nanopartikeln durch BMDM beschrieben, wenn diese zuvor mittels LPS oder IFN γ in das M1-Spektrum polarisiert wurden¹³⁶.

Der vermutete Effekt einer Verminderung der (unspezifischen) Phagozytose-Aktivität durch Givinostat konnte bestätigt werden. Einschränkend stellt die Messung der Phagozytose mit einer einzelnen Partikelart keine umfassende Charakterisierung dieses funktionellen Aspekts dar. Beispielsweise wäre auch eine vermehrte Aufnahme von apoptotischen Zellen durch die Givinostat-inkubierten Makrophagen denkbar, wie es für Glukokortikoid-polarisierte M2-Makrophagen *M(GC)* beschrieben wurde¹²⁸. Darüber hinaus wäre die Untersuchung der Zytokinantwort infolge der Phagozytose lohnenswert. So wurde für intestinale (jejunale) humane Makrophagen *ex vivo* gezeigt, dass sie trotz kräftiger phagozytotischer Aufnahme von Latexkügelchen im Gegensatz zu Monozyten des peripheren Bluts keine nennenswerte Zytokinproduktion zeigten¹²⁵. Da diese *in vivo* die Mikroumgebung und damit den Fortgang einer Entzündung entscheidend mitformt, wäre eine verminderte inflammatorische Zytokinantwort – oder eine modulierende Antwort wie nach Aufnahme apoptotischer Zellen¹³⁵ – im Fall einer chronischen Kolitis ein wünschenswerter therapeutischer Effekt.

Hier kann konstatiert werden, dass die gemachten Beobachtungen in Übereinstimmung mit den oben genannten zwei Untersuchungen^{134,136} und der Annahme aufgrund der Regulation von MARCO sind. Eine feste Einordnung in das M1/M2-Spektrum erfordert Daten zur Effektivität der Phagozytose durch Makrophagen in Abhängigkeit ihres Polarisierungszustands und der Art der aufgenommenen Partikel. In Ermangelung solcher Daten zum jetzigen Zeitpunkt sprechen die vorliegenden Beobachtungen zwar für eine Einordnung in das M2-Spektrum. Diese Behauptung muss jedoch zunächst in weiteren Untersuchungen überprüft werden.

7 Literaturverzeichnis

1. Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, Benchimol EI, Panaccione R, Ghosh S, Barkema HW, Kaplan GG. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology* 2012;142:46-54 e42; quiz e30.
2. van der Valk ME, Mangen MJ, Severs M, van der Have M, Dijkstra G, van Bodegraven AA, Fidder HH, de Jong DJ, van der Woude CJ, Romberg-Camps MJ, Clemens CH, Jansen JM, van de Meeberg PC, Mahmmod N, van der Meulen-de Jong AE, Ponsioen CY, Bolwerk C, Vermeijden JR, Siersema PD, Leenders M, Oldenburg B, group Cs, the Dutch Initiative on C, Colitis. Evolution of Costs of Inflammatory Bowel Disease over Two Years of Follow-Up. *PLoS One* 2016;11:e0142481.
3. Odes S. How expensive is inflammatory bowel disease? A critical analysis. *World J Gastroenterol* 2008;14:6641-7.
4. Shivananda S, Lennard-Jones J, Logan R, Fear N, Price A, Carpenter L, van Blankenstein M. Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). *Gut* 1996;39:690-7.
5. Ananthakrishnan AN. Epidemiology and risk factors for IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2015;12:205-17.
6. Ellinghaus D, Jostins L, Spain SL, Cortes A, Bethune J, Han B, Park YR, Raychaudhuri S, Pouget JG, Hubenthal M, Folseraas T, Wang Y, Esko T, Metspalu A, Westra HJ, Franke L, Pers TH, Weersma RK, Collij V, D'Amato M, Halfvarson J, Jensen AB, Lieb W, Degenhardt F, Forstner AJ, Hofmann A, International IBDGC, International Genetics of Ankylosing Spondylitis C, International PSCSG, Genetic Analysis of Psoriasis C, Psoriasis Association Genetics E, Schreiber S, Mrowietz U, Juran BD, Lazaridis KN, Brunak S, Dale AM, Trembath RC, Weidinger S, Weichenthal M, Ellinghaus E, Elder JT, Barker JN, Andreassen OA, McGovern DP, Karlsen TH, Barrett JC, Parkes M, Brown MA, Franke A. Analysis of five chronic inflammatory diseases identifies 27 new associations and highlights disease-specific patterns at shared loci. *Nat Genet* 2016;48:510-8.
7. Khor B, Gardet A, Xavier RJ. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 2011;474:307-17.
8. de Souza HS, Fiocchi C. Immunopathogenesis of IBD: current state of the art. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2016;13:13-27.
9. Li X, Sundquist J, Hemminki K, Sundquist K. Risk of inflammatory bowel disease in first- and second-generation immigrants in Sweden: a nationwide follow-up study. *Inflamm Bowel Dis* 2011;17:1784-91.
10. Cottone M, Rosselli M, Orlando A, Oliva L, Puleo A, Cappello M, Traina M, Tonelli F, Pagliaro L. Smoking habits and recurrence in Crohn's disease. *Gastroenterology* 1994;106:643-8.
11. Logan RF, Edmond M, Somerville KW, Langman MJ. Smoking and ulcerative colitis. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1984;288:751-3.

12. Rook GA. Hygiene hypothesis and autoimmune diseases. *Clin Rev Allergy Immunol* 2012;42:5-15.
13. Boneberger A, Hangl C, Schierl R, Koletzko S, von Kries R, Kabesch M, Radon K. Endotoxin levels in house dust samples and juvenile inflammatory bowel disease - a case-control study. *J Crohns Colitis* 2011;5:525-30.
14. Calderon-Gomez E, Bassolas-Molina H, Mora-Buch R, Dotti I, Planell N, Esteller M, Gallego M, Marti M, Garcia-Martin C, Martinez-Torro C, Ordas I, Singh S, Panes J, Benitez-Ribas D, Salas A. Commensal-Specific CD4(+) Cells From Patients With Crohn's Disease Have a T-Helper 17 Inflammatory Profile. *Gastroenterology* 2016;151:489-500 e3.
15. Gevers D, Kugathasan S, Denson LA, Vazquez-Baeza Y, Van Treuren W, Ren B, Schwager E, Knights D, Song SJ, Yassour M, Morgan XC, Kostic AD, Luo C, Gonzalez A, McDonald D, Haberman Y, Walters T, Baker S, Rosh J, Stephens M, Heyman M, Markowitz J, Baldassano R, Griffiths A, Sylvester F, Mack D, Kim S, Crandall W, Hyams J, Huttenhower C, Knight R, Xavier RJ. The treatment-naive microbiome in new-onset Crohn's disease. *Cell Host Microbe* 2014;15:382-92.
16. Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, Swidsinski S, Loening-Baucke V, Ortner M, Weber J, Hoffmann U, Schreiber S, Dietel M, Lochs H. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002;122:44-54.
17. Strauss J, Kaplan GG, Beck PL, Rioux K, Panaccione R, Devinney R, Lynch T, Allen-Vercoe E. Invasive potential of gut mucosa-derived *Fusobacterium nucleatum* positively correlates with IBD status of the host. *Inflamm Bowel Dis* 2011;17:1971-8.
18. Chassaing B, Darfeuille-Michaud A. The commensal microbiota and enteropathogens in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2011;140:1720-28.
19. Shaw SY, Blanchard JF, Bernstein CN. Association between the use of antibiotics in the first year of life and pediatric inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2010;105:2687-92.
20. Johansson ME, Phillipson M, Petersson J, Velcich A, Holm L, Hansson GC. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:15064-9.
21. Shi J. Defensins and Paneth cells in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13:1284-92.
22. Bunker JJ, Bendelac A. IgA Responses to Microbiota. *Immunity* 2018;49:211-24.
23. Söderholm JD, Peterson KH, Olaison G, Franzen LE, Westrom B, Magnusson KE, Sjødahl R. Epithelial permeability to proteins in the noninflamed ileum of Crohn's disease? *Gastroenterology* 1999;117:65-72.
24. Zeissig S, Burgel N, Gunzel D, Richter J, Mankertz J, Wahnschaffe U, Kroesen AJ, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD. Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut* 2007;56:61-72.
25. Maloy KJ, Powrie F. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature* 2011;474:298-306.

26. Sonnenberg GF, Artis D. Innate lymphoid cells in the initiation, regulation and resolution of inflammation. *Nat Med* 2015;21:698-708.
27. Melgar S, Karlsson A, Michaelsson E. Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;288:G1328-38.
28. Campbell EL, Bruyninckx WJ, Kelly CJ, Glover LE, McNamee EN, Bowers BE, Bayless AJ, Scully M, Saeedi BJ, Golden-Mason L, Ehrentraut SF, Curtis VF, Burgess A, Garvey JF, Sorensen A, Nemenoff R, Jedlicka P, Taylor CT, Kominsky DJ, Colgan SP. Transmigrating neutrophils shape the mucosal microenvironment through localized oxygen depletion to influence resolution of inflammation. *Immunity* 2014;40:66-77.
29. Little MC, Hurst RJ, Else KJ. Dynamic changes in macrophage activation and proliferation during the development and resolution of intestinal inflammation. *J Immunol* 2014;193:4684-95.
30. Valencia X, Stephens G, Goldbach-Mansky R, Wilson M, Shevach EM, Lipsky PE. TNF downmodulates the function of human CD4⁺CD25^{hi} T-regulatory cells. *Blood* 2006;108:253-61.
31. Spencer DM, Veldman GM, Banerjee S, Willis J, Levine AD. Distinct inflammatory mechanisms mediate early versus late colitis in mice. *Gastroenterology* 2002;122:94-105.
32. Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 1990;98:694-702.
33. Nostrant TT, Kumar NB, Appelman HD. Histopathology differentiates acute self-limited colitis from ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1987;92:318-28.
34. Tanaka T, Kohno H, Suzuki R, Yamada Y, Sugie S, Mori H. A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. *Cancer Sci* 2003;94:965-73.
35. Scheiffele F, Fuss IJ. Induction of TNBS colitis in mice. *Curr Protoc Immunol* 2002;Chapter 15:Unit 15 9.
36. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 2010;140:805-20.
37. Artis D. Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nat Rev Immunol* 2008;8:411-20.
38. Abreu MT. Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nat Rev Immunol* 2010;10:131-44.
39. Maldonado-Contreras AL, McCormick BA. Intestinal epithelial cells and their role in innate mucosal immunity. *Cell Tissue Res* 2011;343:5-12.
40. Eckmann L, Kagnoff MF, Fierer J. Epithelial cells secrete the chemokine interleukin-8 in response to bacterial entry. *Infect Immun* 1993;61:4569-74.
41. Mills CD. M1 and M2 Macrophages: Oracles of Health and Disease. *Crit Rev Immunol* 2012;32:463-88.

42. Yang, Han Z, Oppenheim JJ. Alarmins and immunity. *Immunol Rev* 2017;280:41-56.
43. Kobayashi SD, Voyich JM, Burlak C, DeLeo FR. Neutrophils in the innate immune response. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2005;53:505-17.
44. Inaba K, Inaba M, Naito M, Steinman RM. Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo. *J Exp Med* 1993;178:479-88.
45. Kapsenberg ML, Teunissen MB, Stiekema FE, Keizer HG. Antigen-presenting cell function of dendritic cells and macrophages in proliferative T cell responses to soluble and particulate antigens. *Eur J Immunol* 1986;16:345-50.
46. Steinman RM. Decisions about dendritic cells: past, present, and future. *Annu Rev Immunol* 2012;30:1-22.
47. Shibahara T, Wilcox JN, Couse T, Madara JL. Characterization of epithelial chemoattractants for human intestinal intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterology* 2001;120:60-70.
48. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 2008;8:958-69.
49. Yamane H, Paul WE. Cytokines of the gamma(c) family control CD4+ T cell differentiation and function. *Nat Immunol* 2012;13:1037-44.
50. Arango Duque G, Descoteaux A. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Front Immunol* 2014;5:491.
51. Parnes JR. Molecular biology and function of CD4 and CD8. *Adv Immunol* 1989;44:265-311.
52. Sallusto F. Heterogeneity of Human CD4(+) T Cells Against Microbes. *Annu Rev Immunol* 2016;34:317-34.
53. Treanor B. B-cell receptor: from resting state to activate. *Immunology* 2012;136:21-7.
54. Jurewicz MM, Stern LJ. Class II MHC antigen processing in immune tolerance and inflammation. *Immunogenetics* 2019;71:171-87.
55. Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annu Rev Immunol* 2010;28:445-89.
56. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986;136:2348-57.
57. Rautajoki KJ, Kylaniemi MK, Raghav SK, Rao K, Lahesmaa R. An insight into molecular mechanisms of human T helper cell differentiation. *Ann Med* 2008;40:322-35.
58. Wilke CM, Bishop K, Fox D, Zou W. Deciphering the role of Th17 cells in human disease. *Trends Immunol* 2011;32:603-11.
59. DiPaolo RJ, Brinster C, Davidson TS, Andersson J, Glass D, Shevach EM. Autoantigen-specific TGFbeta-induced Foxp3+ regulatory T cells prevent autoimmunity by inhibiting dendritic cells from activating autoreactive T cells. *J Immunol* 2007;179:4685-93.

60. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 2003;198:1875-86.
61. Murphy KM, Stockinger B. Effector T cell plasticity: flexibility in the face of changing circumstances. *Nat Immunol* 2010;11:674-80.
62. Xue J, Schmidt SV, Sander J, Draffehn A, Krebs W, Quester I, De Nardo D, Gohel TD, Emde M, Schmidleithner L, Ganesan H, Nino-Castro A, Mallmann MR, Labzin L, Theis H, Kraut M, Beyer M, Latz E, Freeman TC, Ulas T, Schultze JL. Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation. *Immunity* 2014;40:274-88.
63. Ginhoux F, Schultze JL, Murray PJ, Ochando J, Biswas SK. New insights into the multidimensional concept of macrophage ontogeny, activation and function. *Nat Immunol* 2016;17:34-40.
64. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdts S, Gordon S, Hamilton JA, Ivashkiv LB, Lawrence T, Locati M, Mantovani A, Martinez FO, Mege JL, Mosser DM, Natoli G, Saeij JP, Schultze JL, Shirey KA, Sica A, Suttles J, Udalova I, van Ginderachter JA, Vogel SN, Wynn TA. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity* 2014;41:14-20.
65. Mantovani A, Bottazzi B, Colotta F, Sozzani S, Ruco L. The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunol Today* 1992;13:265-70.
66. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 2004;25:677-86.
67. Isidro RA, Appleyard CB. Colonic macrophage polarization in homeostasis, inflammation, and cancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2016;311:G59-73.
68. Takada Y, Ye X, Simon S. The integrins. *Genome Biol* 2007;8:215.
69. Garnotel R, Rittie L, Poitevin S, Monboisse JC, Nguyen P, Potron G, Maquart FX, Randoux A, Gillery P. Human blood monocytes interact with type I collagen through alpha x beta 2 integrin (CD11c-CD18, gp150-95). *J Immunol* 2000;164:5928-34.
70. Allavena P, Chieppa M, Monti P, Piemonti L. From pattern recognition receptor to regulator of homeostasis: the double-faced macrophage mannose receptor. *Crit Rev Immunol* 2004;24:179-92.
71. Martinez-Pomares L. The mannose receptor. *J Leukoc Biol* 2012;92:1177-86.
72. Apanius V, Penn D, Slev PR, Ruff LR, Potts WK. The Nature of Selection on the Major Histocompatibility Complex. *Crit Rev Immunol* 2017;37:75-120.
73. Neefjes J, Jongsma ML, Paul P, Bakke O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol* 2011;11:823-36.
74. Gao GF, Jakobsen BK. Molecular interactions of coreceptor CD8 and MHC class I: the molecular basis for functional coordination with the T-cell receptor. *Immunol Today* 2000;21:630-6.
75. Lanier LL, O'Fallon S, Somoza C, Phillips JH, Linsley PS, Okumura K, Ito D, Azuma M. CD80 (B7) and CD86 (B70) provide similar costimulatory signals for T cell proliferation, cytokine production, and generation of CTL. *J Immunol* 1995;154:97-105.

76. Slavik JM, Hutchcroft JE, Bierer BE. CD28/CTLA-4 and CD80/CD86 families: signaling and function. *Immunol Res* 1999;19:1-24.
77. Monaco C, Nanchahal J, Taylor P, Feldmann M. Anti-TNF therapy: past, present and future. *Int Immunol* 2015;27:55-62.
78. Popivanova BK, Kostadinova FI, Furuichi K, Shamekh MM, Kondo T, Wada T, Egashira K, Mukaida N. Blockade of a chemokine, CCL2, reduces chronic colitis-associated carcinogenesis in mice. *Cancer Res* 2009;69:7884-92.
79. Smith PD, Smythies LE, Shen R, Greenwell-Wild T, Gliozzi M, Wahl SM. Intestinal macrophages and response to microbial encroachment. *Mucosal Immunol* 2011;4:31-42.
80. Horn F, Henze C, Heidrich K. Interleukin-6 Signal Transduction and Lymphocyte Function. *Immunobiology* 2000;202:151-67.
81. Heinrich PC, Behrmann I, Muller-Newen G, Schaper F, Graeve L. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* 1998;334 (Pt 2):297-314.
82. Saito M, Yoshida K, Hibi M, Taga T, Kishimoto T. Molecular cloning of a murine IL-6 receptor-associated signal transducer, gp130, and its regulated expression in vivo. *J Immunol* 1992;148:4066-71.
83. Hibi M, Murakami M, Saito M, Hirano T, Taga T, Kishimoto T. Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. *Cell* 1990;63:1149-57.
84. Rose-John S, Heinrich PC. Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function. *Biochem J* 1994;300 (Pt 2):281-90.
85. Matsumoto S, Hara T, Mitsuyama K, Yamamoto M, Tsuruta O, Sata M, Scheller J, Rose-John S, Kado S, Takada T. Essential roles of IL-6 trans-signaling in colonic epithelial cells, induced by the IL-6/soluble-IL-6 receptor derived from lamina propria macrophages, on the development of colitis-associated premalignant cancer in a murine model. *J Immunol* 2010;184:1543-51.
86. Becker C, Fantini MC, Schramm C, Lehr HA, Wirtz S, Nikolaev A, Burg J, Strand S, Kiesslich R, Huber S, Ito H, Nishimoto N, Yoshizaki K, Kishimoto T, Galle PR, Blessing M, Rose-John S, Neurath MF. TGF-beta suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling. *Immunity* 2004;21:491-501.
87. Mudter J, Neurath MF. IL-6 signaling in inflammatory bowel disease: pathophysiological role and clinical relevance. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13:1016-23.
88. O'Garra A. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity* 1998;8:275-83.
89. De Becker G, Moulin V, Tielemans F, De Mattia F, Urbain J, Leo O, Moser M. Regulation of T helper cell differentiation in vivo by soluble and membrane proteins provided by antigen-presenting cells. *Eur J Immunol* 1998;28:3161-71.
90. Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* 2011;11:723-37.
91. Hunter CA. New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions. *Nat Rev Immunol* 2005;5:521-31.

92. Allfrey VG, Faulkner R, Mirsky AE. Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1964;51:786-94.
93. Cress WD, Seto E. Histone deacetylases, transcriptional control, and cancer. *Journal of Cellular Physiology* 2000;184:1-16.
94. Khrapunov SN, Dragan AI, Sivolob AV, Zagariya AM. Mechanisms of stabilizing nucleosome structure. Study of dissociation of histone octamer from DNA. *Biochim Biophys Acta* 1997;1351:213-22.
95. Loidl P. Histone acetylation: facts and questions. *Chromosoma* 1994;103:441-9.
96. Wapenaar H, Dekker FJ. Histone acetyltransferases: challenges in targeting bi-substrate enzymes. *Clin Epigenetics* 2016;8:59.
97. Drazic A, Myklebust LM, Ree R, Arnesen T. The world of protein acetylation. *Biochim Biophys Acta* 2016;1864:1372-401.
98. Yoshida M, Kijima M, Akita M, Beppu T. Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J Biol Chem* 1990;265:17174-9.
99. Tsuji N, Kobayashi M, Nagashima K, Wakisaka Y, Koizumi K. A new antifungal antibiotic, trichostatin. *J Antibiot (Tokyo)* 1976;29:1-6.
100. Yoshida M, Nomura S, Beppu T. Effects of trichostatins on differentiation of murine erythroleukemia cells. *Cancer Res* 1987;47:3688-91.
101. Yu Z, Zhang W, Kone BC. Histone deacetylases augment cytokine induction of the iNOS gene. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:2009-17.
102. Leoni F, Fossati G, Lewis EC, Lee JK, Porro G, Pagani P, Modena D, Moras ML, Pozzi P, Reznikov LL, Siegmund B, Fantuzzi G, Dinarello CA, Mascagni P. The histone deacetylase inhibitor ITF2357 reduces production of pro-inflammatory cytokines in vitro and systemic inflammation in vivo. *Mol Med* 2005;11:1-15.
103. Dokmanovic M, Clarke C, Marks PA. Histone deacetylase inhibitors: overview and perspectives. *Mol Cancer Res* 2007;5:981-9.
104. Furlan A, Monzani V, Reznikov LL, Leoni F, Fossati G, Modena D, Mascagni P, Dinarello CA. Pharmacokinetics, safety and inducible cytokine responses during a phase 1 trial of the oral histone deacetylase inhibitor ITF2357 (givinostat). *Mol Med* 2011;17:353-62.
105. Vojinovic J, Damjanov N. HDAC inhibition in rheumatoid arthritis and juvenile idiopathic arthritis. *Mol Med* 2011;17:397-403.
106. Glauben R, Batra A, Fedke I, Zeitz M, Lehr HA, Leoni F, Mascagni P, Fantuzzi G, Dinarello CA, Siegmund B. Histone hyperacetylation is associated with amelioration of experimental colitis in mice. *J Immunol* 2006;176:5015-22.
107. Glauben R, Batra A, Stroh T, Erben U, Fedke I, Lehr HA, Leoni F, Mascagni P, Dinarello CA, Zeitz M, Siegmund B. Histone deacetylases: novel targets for prevention of colitis-associated cancer in mice. *Gut* 2008;57:613-22.
108. Consortium TU. NOD-derived CD11c +ve dendritic cells cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:F630013B20 product:colony stimulating factor 1 (macrophage), full insert sequence. 2006.

109. Rosen SD. Ligands for L-selectin: homing, inflammation, and beyond. *Annu Rev Immunol* 2004;22:129-56.
110. Lyons AB, Parish CR. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J Immunol Methods* 1994;171:131-7.
111. Foster B, Prussin C, Liu F, Whitmire JK, Whitton JL. Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *Curr Protoc Immunol* 2007;Chapter 6:Unit 6 24.
112. Stewart CC, Lehnert BE, Steinkamp JA. In vitro and in vivo measurement of phagocytosis by flow cytometry. *Methods Enzymol* 1986;132:183-92.
113. Champion JA, Walker A, Mitragotri S. Role of particle size in phagocytosis of polymeric microspheres. *Pharm Res* 2008;25:1815-21.
114. Gu BJ, Sun C, Fuller S, Skarratt KK, Petrou S, Wiley JS. A quantitative method for measuring innate phagocytosis by human monocytes using real-time flow cytometry. *Cytometry A* 2014;85:313-21.
115. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-5.
116. Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 1971;8:871-4.
117. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000;407:770-6.
118. Golay J, Cuppini L, Leoni F, Mico C, Barbui V, Domenghini M, Lombardi L, Neri A, Barbui AM, Salvi A, Pozzi P, Porro G, Pagani P, Fossati G, Mascagni P, Introna M, Rambaldi A. The histone deacetylase inhibitor ITF2357 has anti-leukemic activity in vitro and in vivo and inhibits IL-6 and VEGF production by stromal cells. *Leukemia* 2007;21:1892-900.
119. Pathil A, Armeanu S, Venturelli S, Mascagni P, Weiss TS, Gregor M, Lauer UM, Bitzer M. HDAC inhibitor treatment of hepatoma cells induces both TRAIL-independent apoptosis and restoration of sensitivity to TRAIL. *Hepatology* 2006;43:425-34.
120. Nair AB, Jacob S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *J Basic Clin Pharm* 2016;7:27-31.
121. Vos AC, Wildenberg ME, Duijvestein M, Verhaar AP, van den Brink GR, Hommes DW. Anti-tumor necrosis factor-alpha antibodies induce regulatory macrophages in an Fc region-dependent manner. *Gastroenterology* 2011;140:221-30.
122. Vos AC, Wildenberg ME, Arijs I, Duijvestein M, Verhaar AP, de Hertogh G, Vermeire S, Rutgeerts P, van den Brink GR, Hommes DW. Regulatory macrophages induced by infliximab are involved in healing in vivo and in vitro. *Inflamm Bowel Dis* 2012;18:401-8.
123. Jablonski KA, Amici SA, Webb LM, Ruiz-Rosado Jde D, Popovich PG, Partida-Sanchez S, Guerau-de-Arellano M. Novel Markers to Delineate Murine M1 and M2 Macrophages. *PLoS One* 2015;10:e0145342.
124. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest* 2007;117:175-84.
125. Smythies LE, Sellers M, Clements RH, Mosteller-Barnum M, Meng G, Benjamin WH, Orenstein JM, Smith PD. Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity. *J Clin Invest* 2005;115:66-75.

126. Becker L, Liu NC, Averill MM, Yuan W, Pamir N, Peng Y, Irwin AD, Fu X, Bornfeldt KE, Heinecke JW. Unique proteomic signatures distinguish macrophages and dendritic cells. *PLoS One* 2012;7:e33297.
127. Mevorach D, Mascarenhas JO, Gershov D, Elkon KB. Complement-dependent clearance of apoptotic cells by human macrophages. *J Exp Med* 1998;188:2313-20.
128. Liu Y, Cousin JM, Hughes J, Van Damme J, Seckl JR, Haslett C, Dransfield I, Savill J, Rossi AG. Glucocorticoids promote nonphlogistic phagocytosis of apoptotic leukocytes. *J Immunol* 1999;162:3639-46.
129. Stuart PM, Zlotnik A, Woodward JG. Induction of class I and class II MHC antigen expression on murine bone marrow-derived macrophages by IL-4 (B cell stimulatory factor 1). *J Immunol* 1988;140:1542-7.
130. Briere D, Sudhakar N, Woods DM, Hallin J, Engstrom LD, Aranda R, Chiang H, Sodre AL, Olson P, Weber JS, Christensen JG. The class I/IV HDAC inhibitor mocetinostat increases tumor antigen presentation, decreases immune suppressive cell types and augments checkpoint inhibitor therapy. *Cancer Immunol Immunother* 2018;67:381-92.
131. Steimle V, Siegrist CA, Mottet A, Lisowska-Grospierre B, Mach B. Regulation of MHC class II expression by interferon-gamma mediated by the transactivator gene CIITA. *Science* 1994;265:106-9.
132. Fultz MJ, Barber SA, Dieffenbach CW, Vogel SN. Induction of IFN-gamma in macrophages by lipopolysaccharide. *Int Immunol* 1993;5:1383-92.
133. Glauben R, Sonnenberg E, Wetzel M, Mascagni P, Siegmund B. Histone deacetylase inhibitors modulate interleukin 6-dependent CD4+ T cell polarization in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 2014;289:6142-51.
134. Jozefowski S, Arredouani M, Sulahian T, Kobzik L. Disparate regulation and function of the class A scavenger receptors SR-AI/II and MARCO. *J Immunol* 2005;175:8032-41.
135. Underhill DM, Goodridge HS. Information processing during phagocytosis. *Nat Rev Immunol* 2012;12:492-502.
136. Qie Y, Yuan H, von Roemeling CA, Chen Y, Liu X, Shih KD, Knight JA, Tun HW, Wharen RE, Jiang W, Kim BY. Surface modification of nanoparticles enables selective evasion of phagocytic clearance by distinct macrophage phenotypes. *Sci Rep* 2016;6:26269.

8 Eidesstattliche Versicherung

Ich, Martin Wetzel, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Immunmodulation muriner Makrophagen durch Inhibition von Histondeazetylasen“ 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/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Erstbetreuerin, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Datum

Unterschrift

9 Anteilserklärung an erfolgter Publikation

Martin Wetzel hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Glauben R, Sonnenberg E, Wetzel M, Mascagni P, Siegmund B. Histone deacetylase inhibitors modulate interleukin 6-dependent CD4+ T cell polarization in vitro and in vivo. J Biol Chem 2014; 289:6142-51

Beitrag im Einzelnen:

Aus den von mir geplanten und durchgeführten Experimenten entstand die Abbildung 7 der Publikation. Dies umfasste den durchflusszytometrischen Nachweis von Oberflächenmolekülen auf den Makrophagen nach vorheriger Inkubation mit Givinostat sowie die Konzentrationsbestimmung von IL-6 in deren Zellkulturüberständen mittels Durchflusszytometrie und dem löslichen IL-6-Rezeptor mittels enzymgekoppeltem Immunadsorptionstest.

Unterschrift, Datum und Stempel der erstbetreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden

10 Lebenslauf

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

11 Publikationsliste

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in Teilen in folgender Fachzeitschrift als Originalartikel veröffentlicht:

Glauben R, Sonnenberg E, **Wetzel M**, Mascagni P, Siegmund B. Histone deacetylase inhibitors modulate interleukin 6-dependent CD4⁺ T cell polarization in vitro and in vivo. J Biol Chem 2014; 289:6142-51

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in Teilen auf folgenden Kongressen vorgestellt und als Abstract veröffentlicht:

Wetzel M, Gerling M, Glauben R, Erben U, Zeitz M, Siegmund B. Murine Makrophagen zeigen einen M2-Phänotyp und ein verändertes IL-6-Signaling nach Behandlung mit dem HDAC-Inhibitor Givinostat (ITF2357). 67. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten mit Sektion Endoskopie. Hamburg 2012.

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in Teilen als Poster vorgestellt und als Abstract veröffentlicht:

Wetzel M, Glauben R, Fröhlich F, Mascagni P, Zeitz M, Siegmund B. Induction of M2-like Macrophages via Inhibition of Histone Deacetylases by ITF2357. 40. Jahrestagung der Dt. Gesellschaft für Immunologie. Leipzig 2010.

Wetzel M, Glauben R, Fröhlich F, Mascagni P, Zeitz M, Siegmund B. Induktion des M2-Phänotyps der ‚Wundheilungsmakrophagen‘ durch den HDAC-Inhibitor ITF2357. Jahrestreffen der Deutschen Arbeitsgesellschaft für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (DACED). Mainz 2010.

Wetzel M, Glauben R, Fröhlich F, Mascagni P, Zeitz M, Siegmund B. Induction of M2 Macrophages via Inhibition of Histone Deacetylases. Digestive Disease Week 2011, Chicago IL, USA 2011.

Wetzel M, Gerling M, Glauben T, Stroh T, Erben U, Zeitz M, Siegmund B. P031 Induction of an M2 macrophage phenotype by the HDAC inhibitor ITF2357. 7th Congress of ECCO, Barcelona 2012.

12 Danksagung

Ich bedanke mich bei Frau Professor Dr. Britta Siegmund für die Überlassung des Promotionsthemas, die Aufnahme in die Arbeitsgruppe und ihre wertvolle Unterstützung bei wissenschaftlichen Vorträgen sowie im Schreibprozess.

Ich danke Dr. Rainer Glauben für die Betreuung der Arbeit insbesondere im experimentellen Abschnitt. Frau Inka Freise möchte ich für ihre Hilfestellung bei der Umsetzung und Korrektur von Experimentabläufen danken.

Ich danke dem Graduiertenkolleg *Immuco* des Sonderforschungsbereiches 633 der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung, welches mir die Durchführung des experimentellen Abschnitts der Arbeit erst erlaubt hatte. Darüber hinaus danke ich für das umfangreiche Lehrangebot und die zahlreichen Möglichkeiten wissenschaftlichen Austausches.

Frau Dr. Ulrike Erben gilt mein besonders herzlicher Dank für ihre wertvolle Kritik, ihre präzisen Analysen sowie die zahlreichen scharfsinnigen und warmherzigen Gespräche, die meine Zeit als Doktorand nachhaltig bereicherten.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie für die fortwährende Unterstützung, ihre teils arg strapazierte Geduld sowie ihr Vertrauen in mich.