

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

DISSERTATION

Histon Deazetylase-spezifische Modifikation  
inflammatorischer Mediatoren

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Elena Sonnenberg

aus Berlin

Datum der Promotion: 25.06.2017

*Meinen Eltern*

## Abkürzungsverzeichnis

μ	Mikro-
Abb.	Abbildung
A	Ampère
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaaren
BSA	bovines Serumalbumin
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
CD	engl.: cluster of differentiation
ConA	Concanavalin A
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Deoxynukleotid-Triphosphat
DRFZ	Deutsches Rheuma-Forschungszentrum
dsDNA	Doppelstrang-Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	doppelsträngige RNA
DSS	Dextra-Sulfat-Natrium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (engl.: enzyme-linked immunosorbent assay)
FACS	engl.: fluorescence activated cell sorting
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GM-CSF	engl.: granulocyte macrophage colony-stimulating factor

h	Stunde
HAT	Histon-Azetyltransferase
HDAC	Histon-Deazetylase
HDACi	Histon-Deazetylase-Inhibitor
HRP	engl.: horse radish peroxidase
IFN $\gamma$	Interferon- $\gamma$
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-6R	Interleukin-6 Rezeptor
IPEX	Immunodysregulation Polyendokrinopathie Enteropathie X-chromosomales Syndrom
iTreg	induzierbare regulatorische T-Zellen
JAK	Januskinase
LPMC	engl.: lamina propria mononuclear cells
LPS	Lipopolysaccharid (Endotoxin)
m	Milli
MACS	engl.: magnetic cell sorting
MgCl $_2$	Magnesiumchlorid
MHC	engl.: major histocompatibility complex
Min.	Minute
M-MLV	engl.: moloney murine leukemia virus
mRNA	engl.: messenger RNA
n	Nano
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
PBMC	periphere mononukleäre Zellen
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung

PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
PKC	Protein-Kinase C
PMA	Phorbol-12- Myristat-13-Acetat
R	Rezeptor
qPCR	Real-Time-quantitative PCR
RCT	engl.: randomized controlled trial
RISC	engl.: RNA induced silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	Ribonukleinsäure-Interferenz
RNase	Ribonuklease
s	Sekunde
SAHA	engl.: suberoylanilide hydroxamic acid
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	engl.: small interfering RNA
STAT	engl.: signal transducer and activator of transcription
TGF- $\beta$	engl.: transforming growth factor- $\beta$
Th	T-Helfer
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
Treg	regulatorische T-Zellen
TsA	Trichostatin A
TZR	T-Zellrezeptor
TZM	T-Zellmedium
V	Volt

## Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung .....	1
2	Einleitung .....	5
2.1	Histone .....	5
2.1.1	Histon-Deazetylierung und Azetylierung als Teil der Genregulation .....	6
2.1.2	Histon-Deazetylase-Inhibitoren .....	8
2.1.3	ITF2357 .....	9
2.2	T-Zellen .....	10
2.2.1	Aktivierung von T-Zellen .....	10
2.2.2	T-Helferzellen .....	11
2.2.3	Regulatorische T-Zellen .....	12
2.3	Gleichgewicht Th17/Treg und dessen Bedeutung für die Entstehung chronisch entzündlicher Erkrankungen .....	13
2.4	Bedeutung von Interleukin-6 für die Differenzierung von Th17-Zellen .....	13
2.5	Der Interleukin-6 Rezeptor .....	14
2.6	Ribonukleinsäure-Interferenz .....	14
2.7	Elektroporation .....	16
2.8	Hinleitung zum Thema .....	16
3	Material und Methoden .....	18
3.1	Mäuse .....	18
3.2	Chemikalien und Enzyme .....	18
3.3	Puffer und Medien .....	19
3.4	MACS („magnetic-activated cell sorting) Beads und Säulen für Zellsortierungen .....	20
3.5	Kits .....	20
3.6	Antikörper .....	20
3.7	Synthetisches Peptid .....	22
3.8	Geräte .....	22
3.9	Verbrauchsmaterialien .....	22
3.10	Tötung und Organentnahme .....	23
3.10.1	Zellisolation aus Lymphknoten und Milz .....	23
3.10.2	Sortieren von Zellen mit Hilfe von MACS .....	23
3.10.3	Isolation CD4 <sup>+</sup> -Zellen .....	25
3.10.4	Isolation naiver T-Zellen .....	25
3.10.5	Isolation von Antigen-präsentierenden Zellen .....	25
3.10.6	<i>In vitro</i> -Kultur muriner T-Zellen .....	26
3.10.7	Stimulation der Zellen .....	26
3.10.8	Behandlung und Einsatz der Antigen-präsentierenden Zellen .....	27
3.10.9	Polarisierung der Th-Zellen .....	27
3.10.10	Stimulation der CD4 <sup>+</sup> -Zellen mit CD3/CD28 .....	27
3.10.11	Stimulation der mit dem Histon-Deazetylase-Inhibitor ITF2357 behandelten CD4 <sup>+</sup> -Zellen mit ConA .....	27
3.10.12	Behandlung der naiven CD4 <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> -Zellen mit dem Histon-Deazetylase- Inhibitor ITF2357 unter Th1 polarisierenden Bedingungen .....	28
3.11	Durchflusszytometrie .....	28
3.11.1	Intrazelluläre Färbung .....	29
3.11.2	Färbung mit Propidiumiodid .....	29
3.12	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA) .....	30
3.13	RNA-Interferenz .....	31
3.14	Elektroporation .....	32

3.14.1	Aufarbeitung der RNA.....	33
3.14.2	Umschreiben in cDNA mit M-MLV RT.....	33
3.14.3	Realtime-quantitative-PCR .....	34
3.15	Normalisierung.....	36
3.16	Western-Blot.....	36
3.16.1	Blotting.....	37
3.16.2	Bindung der spezifischen Antikörper.....	37
3.16.3	Visualisierung der Proteinbanden .....	37
3.17	Chromatin-Immünpräzipitation mittels MACS-Technologie.....	38
3.18	Statistik .....	38
4	Ergebnisse .....	39
4.1	Wirkung des Histon-Deazetylase-Inhibitors ITF2357 auf die Zytokinproduktion von CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen .....	39
4.1.1	Wirkung des Histon-Deazetylase-Inhibitors ITF2357 auf CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen nach anti-CD3/-CD28 Stimulation.....	39
4.1.2	Wirkung auf CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen unter Concanavalin A-Stimulation.....	40
4.2	Wirkung des Histon-Deazetylase-Inhibitors ITF2357 auf Th1-Polarisierung im Antigen-spezifischen System .....	41
4.3	Wirkung des HDAC-Inhibitors ITF2357 auf den IL-6-Rezeptor bei naiven T- Zellen .....	43
4.4	Einsatz der siRNA-Technologie zur Charakterisierung funktioneller Eigenschaften einzelner HDAC .....	45
4.4.	Entwicklung optimaler Transfektionsbedingungen .....	45
4.4.2	Dauer des Effektes der siRNA .....	45
4.4.3	Einfluss der Voltzahl und der Impulslänge auf die Transfektionseffizienz.....	47
4.5	Auswahl der siRNA .....	49
4.6	Wirkung spezifischer HDAC auf die IFN $\gamma$ -Produktion.....	50
5	Diskussion .....	52
5.1	HDAC-Inhibition durch ITF2357 .....	52
5.2	Einfluss der unterschiedlichen Stimulationsformen auf die Wirkung des HDAC-Inhibitors in CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen .....	54
5.3	Einfluss des HDAC-Inhibitors auf T-Zellpolarisierung .....	55
5.4	Einfluss der HDACi auf den IL-6R.....	56
5.5	Einsatz der RNA Interferenz zur Charakterisierung der spezifischen Wirkung einzelner HDAC .....	57
5.6	Funktionelle Relevanz von HDAC5, HDAC7 und HDAC9.....	61
6	Schlussfolgerung und Ausblick .....	63
7	Literaturverzeichnis.....	65
8	Abbildungsverzeichnis .....	73
9	Tabellenverzeichnis .....	74
10	Eidesstattliche Versicherung.....	75
11	Lebenslauf .....	77
12	Publikationsliste .....	78
13	Danksagung.....	79

### 1 Zusammenfassung

#### Einleitung

Histon-Deazetylase (HDAC)-Inhibitoren sind für ihre anti-proliferativen und pro-apoptischen Eigenschaften bekannt. Darüber hinaus sind ihre anti-inflammatorischen Eigenschaften in den Fokus gerückt. Der Einsatz von HDAC-Inhibitoren führt zu einer Verbesserung der experimentellen Kolitis in Mausmodellen, wobei Mechanismen die diese Effekte vermitteln unklar sind. Bekannt ist, dass für Modelle der experimentellen Kolitis T-Zellsubpopulationen entscheidend sind. Um mögliche Mechanismen der HDAC-Inhibitoren in Bezug auf T-Zellen aufzuklären, wurde der Effekt auf die Zytokinfreisetzung untersucht. Da die T-Zellpolarisierung und damit Entstehung inflammatorischer und regulatorischer Subpopulationen eine zentrale Schaltstelle für die mukosale Homöostase darstellt, wurde die Auswirkung des Pan-HDAC-Inhibitors ITF2357 auf die Polarisierung von naiven T-Zellen untersucht. Diesen Gedanken verfolgend wurde der Einfluss des Inhibitors auf den IL-6R untersucht, da IL-6 das entscheidende Zytokin für die Polarisierung pro-inflammatorischer Th17-Zellen darstellt. Um die Relevanz einzelner HDAC auf die anti-inflammatorischen Effekte definieren zu können, wurden diese HDAC durch siRNA-Technologie spezifisch supprimiert, die potentiell für die Vermittlung inflammatorischer Prozesse verantwortlich sind.

#### Methoden

Murine CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden aus Milzen und Lymphknoten isoliert, mit ITF2357 behandelt und mittels Concanvalin A oder anti-CD3/anti-CD28 stimuliert. Anschließend wurde die IFN $\gamma$ -Produktion mittels ELISA analysiert. Ebenso gewonnene naive T-Zellen (CD4<sup>+</sup>/CD62L<sup>+</sup>) wurden in An- oder Abwesenheit von ITF2357 unter Th1-polarisierenden Bedingungen stimuliert und nach 48 h die IFN $\gamma$ -Konzentration mittels ELISA bestimmt. Die Interleukin-6 Rezeptor (IL-6R) mRNA Expression wurde in unterschiedlich behandelten T-Lymphozyten mittels quantitativer PCR bestimmt. Mittels Chromatinimmunpräzipitation (ChIP) und anschließender quantitativer PCR wurde die Histon 3-Azetylierung am *Il6r*-Genlocus bei naiven T-Lymphozyten nach Inkubation mit ITF2357 untersucht. Mittels siRNA-Technologie wurden einzelne HDAC spezifisch gehemmt und exemplarisch der Effekt auf die IFN $\gamma$ -Produktion auf mRNA-Ebene analysiert.



### Ergebnisse

ITF2357 inhibiert die IFN $\gamma$ -Produktion von naiven CD4<sup>+</sup>-T-Zellen. Für diesen Effekt ist entscheidend, ob mit Concanvalin A oder anti-CD3/anti-CD28 stimuliert wurde. Auch führt die Zugabe des Inhibitors zu naiven CD4<sup>+</sup>-T-Zellen unter Th1 polarisierenden Bedingungen zu einer Zunahme der IFN $\gamma$  produzierenden Zellen. Als eine mechanistische Erklärung für den anti-inflammatorischen Effekt des HDAC-Inhibitors konnte eine Abnahme der IL-6R-Expression auf naiven T-Zellen nach Behandlung mit ITF2357 gezeigt werden. Der IL-6/IL-6R-Signalweg ist für die Polarisierung von Th17 Zellen entscheidend. Unter Einsatz der siRNA-Technologie konnten die HDAC 5, 7 sowie 9 als kritische HDAC für die Vermittlung inflammatorischer Prozesse identifiziert werden.

### Schlussfolgerungen

Die hier vorliegende Arbeit konnte den anti-inflammatorischen Effekt von ITF2357 auf CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zeigen. Entscheidend für die Vermittlung dieses Effektes ist die Wirkung des Inhibitors auf den IL-6/IL-6R-Signalweg der naiven T-Zellen und somit auf die Polarisierung von Th17-Zellen. Die HDAC 5, 7 und 9 konnten als mögliche therapeutische Zielstrukturen identifiziert werden.

### Abstract

#### Introduction

Histone deacetylase (HDAC) inhibitors have been known for their pro-apoptotic and anti-proliferative capacities. Recent studies also described anti-inflammatory effects *in vitro* and *in vivo*. The present study investigated the effect of the HDAC inhibitor ITF2357 on cytokine release of naïve CD4<sup>+</sup>-T-cells. Additionally the effect of ITF2357 on T cell polarization towards Th1-cells was studied.

To furthermore investigate the mechanisms behind the anti-inflammatory potency of HDAC inhibitors, the effect on the interleukin-6 receptor (IL-6R) mRNA expression of naïve CD4<sup>+</sup> T cells was evaluated. IL-6 is one of the key cytokines mediating the polarization of the pro-inflammatory T helper 17 (Th17) cells that are known for their ability in maintaining inflammation and autoimmune diseases. In the second part the aim was to define the specific impact of single HDAC in mediating these anti-inflammatory effects.

#### Methods

After isolation from spleens and lymph nodes, murine CD4<sup>+</sup> T cells were treated with the HDAC inhibitor ITF2357. The interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) release was determined by ELISA. In addition, the expression of the IL-6R mRNA in CD4<sup>+</sup> T cells in the presence or absence of the pan-HDAC inhibitor ITF2357 was evaluated via quantitative PCR. In order to assess histone 3 acetylation at the site of the *Il6r* locus in naïve T cells, chromatin immunoprecipitation (ChIP) was performed. siRNA technology served to inhibit specific HDAC and IFN $\gamma$  production was analyzed on the mRNA level as readout.

#### Results

The HDAC inhibitor ITF2357 showed an anti-inflammatory effect on naïve CD4<sup>+</sup> T cells. Here the mode of stimulation either with Concanvalin A or anti-CD3/ -CD28 played a critical role with regard to the effect of the inhibitor.

Adding the inhibitor to CD4<sup>+</sup> T cells under Th1 polarizing conditions leads to an increase of IFN $\gamma$  producing cells.

In the presence of ITF2357 a decrease of the IL-6R mRNA expression on naïve CD4<sup>+</sup> T cells was observed, serving as a possible mechanistic explanation for the anti-

inflammatory effects, since the IL-6/IL-6R pathway is crucial for polarizing Th17 cells. By applying siRNA technology, HDAC5, 7 and 9 were identified as key HDAC in mediating the anti-inflammatory effects.

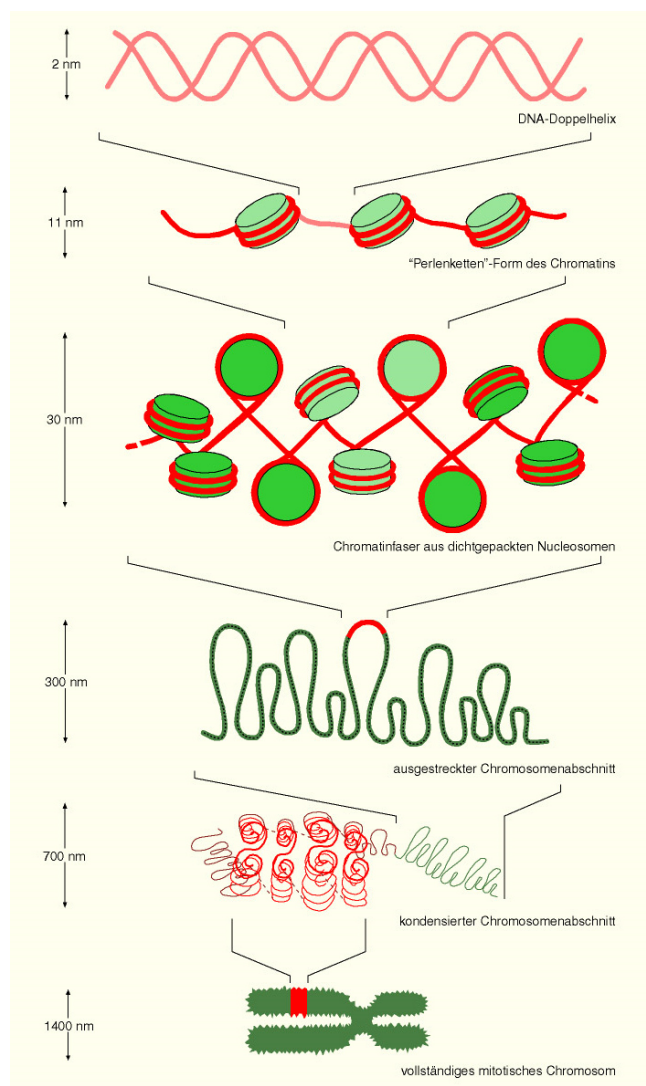
### Conclusion

The present study was able to demonstrate an anti-inflammatory effect of HDAC inhibitors on naïve CD4<sup>+</sup> T cells. Down-regulation of the IL-6R mRNA expression could be revealed as one potential mechanism in naïve CD4<sup>+</sup> T cells. Furthermore, HDAC5, 7 and 9 were identified as key HDAC in mediating the observed effects and hence might serve as target structures for future therapeutic approaches.

## 2 Einleitung

### 2.1 Histone

In eukaryoten Zellen ist der Hauptteil der Erbinformation als Chromosom im Zellkern organisiert. Die einzelnen Chromosomen bestehen aus einem Verbund von Desoxyribonukleinsäure (DNA) und Proteinen, welcher auch Chromatin genannt wird. Das Chromatin ist zusammengesetzt aus Histonen und der DNA, die sich in  $1\frac{3}{4}$  Windungen um diese Histone legt. DNA und Histone bilden so die Nucleosomen, die kettenförmig aneinandergereiht sind und als kleinste Struktureinheit des Chromatins gelten [1]. Dies ist schematisch in Abbildung 1 dargestellt.



**Abbildung 1: Organisation der DNA**

Die DNA wird über mehrere Stufen verpackt und bildet schließlich das hoch kondensierte Mitose-Chromosom. FIZ Chemie Berlin, Abbildungen modifiziert nach: B. Alberts, D. Bray, J. Lewis et al., Molecular Biology of the Cell, 2002, [ISBN] 0-8153-4072-9"

Jedes Histon enthält zwei abgegrenzte Strukturbereiche. Eine zentrale Domäne, die an der Interaktion der Histone und der um diese gewickelten DNA beteiligt ist und eine weitere aus 25-40 Resten bestehende, unstrukturierte lysin- und argininreiche Domäne am Aminoende [3, 4]. Die Histon-Enden bieten die Möglichkeit für vielerlei posttranskriptionelle Histon-Modifikationen wie Methylierung, Phosphorylierung sowie Azetylierung, auf die im Folgenden genauer eingegangen wird.

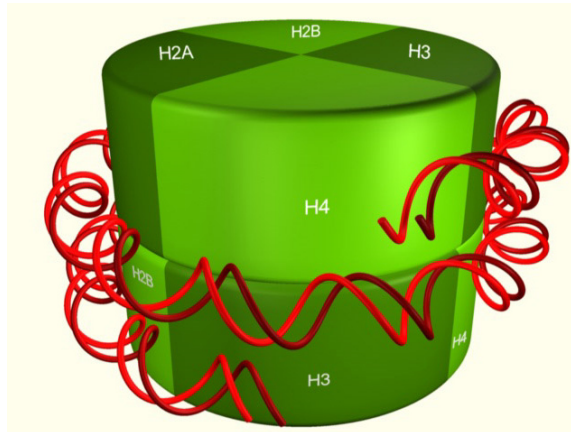


Abbildung 2: Nucleosom

Ein Nucleosom ist ein Komplex aus acht Histon-Proteinen, um den sich ca. 200 Nukleotide DNA winden. Die einzelnen Nucleosomen sind über das Histon H1 miteinander verbunden.  
FIZ Chemie Berlin, Abbildungen modifiziert nach: B. Alberts, D. Bray, J. Lewis et al., Molecular Biology of the Cell, 2002, [ISBN] 0-8153-4072-9"

### **2.1.1 Histon-Deazetylierung und Azetylierung als Teil der Genregulation**

Histonmodifikationen wie Histon-Azetylierung und Histon-Deazetylierung sind als epigenetische Mechanismen an der Regulation von Genexpression über Veränderungen der DNA-Struktur beteiligt. Die Zu- oder Abnahme der Azetylierung führt zu einer stärkeren oder schwächeren Verpackung des Chromatins und somit zu einer Modifikation der Promotorbindung für Transkriptionsfaktoren [4-6].

Die Histon-Azetylierung selbst findet an den evolutionär konservierten Lysin-Resten, welche sich am N-Terminus befinden statt [3, 4]. Dadurch werden die positiven Ladungen am Histonprotein azetyliert, was die Affinität zwischen den Histonen und der negativ geladenen DNA herabsetzt. Die Transkriptionsfaktoren erlangen so besseren Zugang zu der Promotorregion. Dies resultiert in den meisten Fällen in einer vermehrten Transkription [4-6]. Die Histon-Azetylierung wird durch Histon-Azetyltransferasen

(HATs) katalysiert. Zu den HATs zählen z.B. HAT1, CBP und p300 [7]. Bei der Histon-Deazetylierung werden die Azetylgruppen vom Lysin entfernt, dadurch werden die positiven Ladungen am Histon wieder vermehrt und es kommt zur engeren Bindung zwischen dem Nukleosom und der darum organisierten DNA [8]. Die dadurch entstandene stärkere Bindung der DNA führt zu einem kondensierten Chromatin, welches für Transkriptionsfaktoren nur noch schwer zugänglich ist und somit eine verminderte Transkription nach sich zieht.

Folglich ist bei vermehrter Azetylierung eine größere transkriptionelle Aktivität zu finden, während bei verminderter Azetylierung mit inaktivem, kondensiertem Chromatin eine Suppression der Genexpression zu erwarten ist. Der Grad der Azetylierung ist abhängig vom Zusammenspiel zwischen den zuvor erwähnten HATs und den Histon-Deazetylasen (HDAC).

Beim Menschen sind inzwischen 18 verschiedene HDAC bekannt, die anhand ihrer Zink-Abhängigkeit bezüglich der enzymatischen Aktivität in verschiedene Klassen unterteilt werden [9]. Die Klasse I HDAC (HDAC 1, 2, 3 und 8) zeigen die größte Verwandtschaft mit dem Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) Transkriptionsfaktor Rpd3p. Die Klasse II HDAC (HDAC 4 bis 7, 9 und 10) haben Ähnlichkeit mit HDAC1 einer anderen in der Hefe identifizierten Deazetylase (4 und 9). Bei den Klasse III HDAC handelt es sich um die Sirtuine 1-7, sie benötigen  $\text{NAD}^+$ , sind jedoch nicht Zink-abhängig, so dass sie nicht von Inhibitoren beeinflusst werden, die Zink-abhängige Deazetylasen hemmen. Der Klasse IV wird HDAC 11 zugeordnet [10].

Die HDAC der Klasse I befinden sich fast ausschließlich im Zellkern und werden konstitutiv exprimiert [11, 12]. Die Klasse II HDAC sind induzierbar und können zwischen Zellkern und Zytoplasma hin- und her bewegt werden.

Der Wirkmechanismus der HDAC beinhaltet das Entfernen der Azetylgruppe vom Histon oder alternativ von Proteinkomplexen. Die am besten untersuchten HDAC scheinen Aufgaben als allgemeine Transkriptionsregulatoren inne zu haben [13, 14]. Es kommt durch verschiedene HDAC zur Repression von Genen, die unter anderem für Transkription, Tumorsuppression und Wachstumsfaktoren zuständig sind und damit zu Veränderungen in Zellzyklus und -differenzierung führen [4, 15].

Inzwischen ist bekannt, dass auch viele andere Nicht-Histonproteine Zielsubstrat der HDAC und HAT sein können. Gerade in der Karzinogenese scheint dies von

entscheidender Bedeutung zu sein. Hier zeigen sich unter anderem die Transkriptionsfaktoren p53, STAT3 sensibel für den Einfluss von HDAC und HAT [16].

### 2.1.2 Histon-Deazetylase-Inhibitoren

Im Laufe der letzten Jahrzehnte wurden zahlreiche Histon-Deazetylase-Inhibitoren (HDACi) identifiziert. Es werden vier verschiedene pharmakologische Klassen von HDACi unterschieden, die in Tabelle 1 aufgeführt sind.

Tabelle 1: Übersicht der pharmakologischen HDACi-Klassen [17]

Pharmakologische Klasse	Beispielsubstanz	Wirkkonzentration
Hydroxaminsäuren	ITF2357	nM
	„suberoylanilide hydroxamic acid“ (SAHA)	nM
	Pyroxamid	nM
	Trichostatin A (TsA)	
kurzkettige Fettsäuren	Valproinsäure	µM
	Phenylbutyrat	µM
zyklische Peptide	Depsipeptid	nM
	Trapoxin	
Benzamide	MS-275	µM
	CI-994	µM

Den HDACi werden vor allem anti-proliferative und Apoptose-induzierende Eigenschaften zugesprochen, was dazu geführt hat, dass diese intensiv als mögliche Therapien für solide Tumoren und maligne hämatologische Erkrankungen untersucht wurden [17-19].

Im Tiermodell erzielen die Substanzen überzeugende Ergebnisse und zeigten geringe Nebenwirkungen. Auch in klinischen Studien wurden HDACi untersucht und ein Vertreter aus der Gruppe der Hydroxaminsäuren, das „suberoylanilide hydroxamid acid“ (SAHA; Vorinostat®), ist in den USA inzwischen für die Behandlung des kutanen T-Zelllymphoms zugelassen. Die Plasmaspiegel des Inhibitors befinden sich dabei im mikromolaren Bereich [20].

Neben den zuvor beschriebenen anti-proliferativen Eigenschaften ist inzwischen klar, dass die HDACi auch anti-inflammatorische Eigenschaften besitzen [21-23]. In *in vitro*-Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von LPS-stimulierten peripheren mononukleären Zellen (PBMC) mit HDACi aller Klassen zu einer dosis-

abhängigen Suppression pro-inflammatorischer Zytokine wie Interferon  $\gamma$  ( $\text{IFN}\gamma$ ), Tumornekrosefaktor  $\alpha$  ( $\text{TNF}\alpha$ ) und Interleukin (IL) -1 $\beta$  führt [21, 22].

*In vivo* konnte die anti-inflammatorische Wirkung zunächst in der Concanavalin A (ConA)-induzierten Hepatitis und dem LPS-induzierten Schock in der Maus demonstriert werden [21]. Weitere Arbeiten zeigten am Beispiel experimenteller Kolitismodelle, dass diese anti-inflammatorischen Effekte unabhängig von der HDACi-Klasse erzielt werden können [22]. Die Behandlung der Tiere mit einem HDACi resultierte in einer Verminderung des Schweregrades der Kolitis, sowohl makroskopisch als auch histologisch, sowie in einer Suppression der lokalen Produktion pro-inflammatorischer Zytokine wie  $\text{IFN}\gamma$  und  $\text{TNF}\alpha$ .

Nicht nur für die Hämato-Onkologie, sondern auch für den Bereich der Entzündung werden HDACi im Rahmen klinischer Studien untersucht. So wird der HDAC-Inhibitor ITF2357 im Augenblick auf seine Wirkung bei der Behandlung von Morbus Crohn und juveniler Arthritis hin getestet [24].

Auch konnte eine Überschneidung beider Einsatzgebiete gezeigt werden. Die Entwicklung bösartiger Tumore stellt bei den chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen wie Kolitis ulcerosa und Morbus Crohn als Spätkomplikation ein Risiko dar. Es ist also von großer Bedeutung schon die Entzündung frühzeitig adäquat zu behandeln. Hier könnte den HDACi eine ganz besondere Rolle zukommen, da sie einen dualen Effekt besitzen indem sie bereits über die Hemmung der Entzündung die Karzinogenese reduzieren, aber auch diese selbst bekämpfen [25].

### **2.1.3 ITF2357**

ITF2357 (Givinostat®) zählt zu den Hydroxamin-Säuren und hat vor allem Einfluss auf die HDAC Klasse I und II. Es wurde gezeigt, dass ITF2357 inhibierend auf die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine wirkt [26], eine pro-apoptotische [27] und eine zytotoxische Wirkung *in vitro* auf verschiedene Tumorzelllinien ausübt. Auch *in vivo* konnte im Mausmodell ein anti-neoplastischer Effekt dieses Inhibitors bereits bestätigt werden [28].



Bezüglich der Anwendung beim Menschen zeigte sich in einer Phase II - Studie in der Behandlung der juvenilen Arthritis durch die Behandlung mit ITF2357 eine signifikante Reduktion der Anzahl schmerzender Gelenke sowie der Parameter für eine systemische Erkrankung [29].

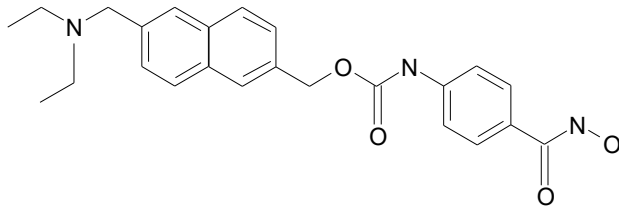


Abbildung 3: Strukturformel ITF2357 (Givinostat®)

ITF2357 ist ein potenter Inhibitor HDAC-Isoformen, welcher sowohl anti-inflammatorisch als auch anti-neoplastisch wirkt [28] [26].

## 2.2 T-Zellen

Alle T-Zellen stammen von hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks ab und wandern für die weitere Reifung in den Thymus. Hier durchlaufen die Thymozyten auf dem Weg zu einer reifen T-Zelle neben einer positiven und einer negativen Selektion eine Veränderung der Oberflächenmoleküle, wie dem T- Zellrezeptor (TZR) selber oder den Korezeptoren CD4 und CD8.

CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten gelten im Allgemeinen als T-Helferzellen (Th) und besitzen einen Rezeptor, der Antigene im Kontext von MHC Klasse II-Molekülen erkennt. CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten gelten als zytotoxische T-Zellen und besitzen einen MHC I erkennenden T-Zellrezeptor [30, 31].

### 2.2.1 Aktivierung von T-Zellen

Voraussetzung für die Aktivierung einer naiven T-Zelle, sind zwei Dinge: Die Zelle muss zum einen ein körperfremdes Peptidfragment erkennen, das an ein körpereigenes MHC-Molekül gebunden ist. Zum anderen muss sie ein kostimulatorisches Signal durch eine Antigen-präsentierende Zelle (APZ) erhalten [32, 33]. Professionelle APZ wie B-Zellen, Makrophagen sowie Dendritische Zellen können beide MHC-Klassen exprimieren und tragen gleichzeitig die notwendigen kostimulatorischen Moleküle, B7.1 (CD80) und/ oder B7.2 (CD86), auf ihrer Zelloberfläche. Dieser Vorgang, der zur

klonalen Expansion der T-Zellen und zu ihrer Differenzierung zu verschiedenen T-Effektorzellen führt, wird auch „Priming“ genannt. Eines dieser kostimulatorischen Moleküle ist CD28. Die Bindung an die Liganden B7.1 (CD80) und/ oder B7.2 (CD86) auf der APZ führt gemeinsam mit der Bindung an den TZR zu einer vermehrten Produktion von IL-2. Erst diese Verbindung macht die klonale Expansion der T-Lymphozyten möglich [34].

### 2.2.2 T-Helferzellen

CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen werden hauptsächlich aufgrund der von ihnen sezernierten Zytokine in mehrere Subpopulationen unterteilt, die jeweils unterschiedliche Funktionen ausüben. *Mosmann und Mitarbeiter* definierten bereits 1986 die Th1-Zellen als IL-2, IFN $\gamma$ , „granulocyte macrophage colony-stimulating factor“ (GM-CSF) und IL-3 produzierende und Th2-Zellen als IL-4, IL-5 und IL-3 produzierende Population [31]. Immer noch gilt IFN $\gamma$  als das charakterisierende Zytokin für Th1-Zellen und IL-4 als das Th2 - definierende Zytokin.

Neben den Th1- und Th2-Zellen wurde 2005 von *Harrington et al.* und *Park et al.* mit den Th17-Zellen eine weitere Subpopulation beschrieben. Charakterisiert werden diese Zellen durch die Zytokine IL-17A und IL-17F [35, 36]. In den letzten Jahren sind weitere T-Zell-Subpopulationen beschrieben worden. *Veldhoen et al.* zeigen beispielsweise in ihrer Arbeit, dass der „transforming growth factor- $\beta$ “ (TGF- $\beta$ ) Th2-Zellen dazu bringt, ihr charakteristisches Zytokinprofil zu verlieren und zu einer IL-9-Sekretion überzugehen. In der Kombination mit IL-4 entstehen Th9-Zellen [37].

Die Entwicklung zu den verschiedenen Zelltypen ist nicht vorherbestimmt, obliegt aber dem Einfluss verschiedener Faktoren. Zunächst muss die naive CD4<sup>+</sup>-T-Zelle über den TZR-Komplex aktiviert werden, für die darauf folgende Polarisierung spielen verschiedene Zytokine eine kritische Rolle. Aktuell wird diskutiert, dass die Plastizität und die Interkonvertierbarkeit der verschiedenen Th-Zellsubpopulationen sehr viel stärker ausgeprägt sind, als zuvor angenommen [38].

Für die Differenzierung zu Th2-Zellen wurde IL-4 als entscheidender Faktor identifiziert [39], während einige Jahre später IL-12 als Th1 polarisierender Faktor identifiziert werden konnte [40]. Inzwischen geht man davon aus, dass auch über IFN $\gamma$  wichtige

Signale für die Entstehung von Th1-Antworten übermittelt werden [41]. Bei den Th17-Zellen findet die Differenzierung nur unter Anwesenheit von TGF- $\beta$  und IL-6 statt. Neben den Unterschieden im Zytokinprofil können den einzelnen Subpopulationen auch unterschiedliche funktionelle Eigenschaften *in vivo* zugeordnet werden. Die Sekretion von Th1-Zytokinen wie IFN $\gamma$  verstärkt die zelluläre und inflammatorische Immunreaktion phagozytischer Zellen. So ist die Makrophagenaktivierung mit als Hauptaufgabe der Th1-Zellen anzusehen [42]. Die Th17-Zellen sind in den letzten Jahren stark in den Fokus der Entstehung von vielen entzündlichen und anderen Autoimmunerkrankungen gerückt [35, 43]. So konnte die Gruppe um Brigitta Stockinger 2006 erstmalig zeigen, dass die Entstehung der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis ohne TGF- $\beta$  vermittelte Signalwege in Th-Zellen nicht möglich ist [44]. Die Entstehung von Autoimmunerkrankungen ist also untrennbar mit dem Vorhandensein von Th17-Zellen verbunden [43].

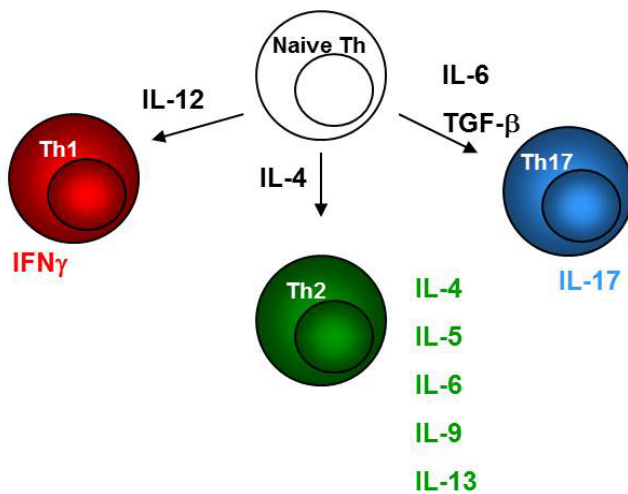


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Differenzierung von naiven Th-Zellen

Die Differenzierung der naiven Th-Zellen zu Th1-, Th2- und Th17-Zellen wird durch das Vorhandensein spezifischer Zytokine nach Aktivierung des TZR gesteuert. Die Charakterisierung der entstandenen Effektorzellpopulationen erfolgt anhand ihres Zytokinprofils sowie ihrer funktionellen Eigenschaften

### 2.2.3 Regulatorische T-Zellen

Zu den verschiedenen Subpopulationen der T-Helferzellen werden auch die regulatorischen T-Zellen (Treg) gezählt. Es handelt sich um eine T-Zellpopulation deren Hauptaufgabe darin besteht, die Aktivierung des Immunsystems zu unterdrücken und somit für die Aufrechterhaltung der Toleranz gegen den eigenen Organismus zu sorgen

[45]. Bei der Gruppe der Treg handelt es sich um eine heterogene Gruppe, es existieren Zellen die  $CD4^+CD25^+$  exprimieren und im Thymus entstehen [5]. Als spezifischer Marker für Treg wurde das Forkhead-Box-Protein P3 (FoxP3) identifiziert [46]. Die immunmodulatorischen Eigenschaften der Treg-Zellen sind in den letzten Jahren in den Fokus der verschiedensten medizinischen Bereiche gerückt. Ein klinisches Beispiel für die Wichtigkeit von intaktem FoxP3 und der konsekutiven Funktionstüchtigkeit von Treg ist das IPEX-Syndrom (engl. immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked syndrome). Hierbei kommt es durch einen Defekt im FoxP3-Genlocus zu einer Dysfunktion der Treg und in der Folge zu den verschiedensten Krankheitserscheinungen wie unter anderem bullösen, ekzematösen Hautveränderungen, schweren intestinalen Störungen und Diabetes mellitus [47].

### **2.3 Gleichgewicht Th17/Treg und dessen Bedeutung für die Entstehung chronisch entzündlicher Erkrankungen**

Wenn das Zusammenspiel dieser Th17 und regulatorischen T-Zellen aus dem Gleichgewicht gerät führt dies zu einer negativen Beeinflussung von Entzündungen. Es konnte gezeigt werden, dass unter anderem die Schwere von intestinalen Entzündungen durch die Homöostase dieser beiden Zelltypen beeinflusst wird [48]. Untermuert werden konnten diese Beobachtungen dadurch, dass in verschiedenen Modellen der experimentellen Kolitis gezeigt werden konnte, dass die Zugabe von  $T_{reg}$ -Zellen zu einer Verbesserung der Entzündung führt [49].

### **2.4 Bedeutung von Interleukin-6 für die Differenzierung von Th17-Zellen**

Für die Polarisierung von Th17-Zellen sowie FoxP3-Zellen *in vitro* wird, wie schon zuvor beschrieben, die Zugabe von TGF $\beta$  benötigt. Gibt man zusätzlich IL-6 hinzu kommt es zur Polarisierung zu Th17-Zellen. Dies zeigt die entscheidende Bedeutung von IL-6 für die Entstehung von Th17-Zellen gegenüber induzierbaren Treg (iTreg) [50].

Das Zytokin IL-6 nimmt bei inflammatorischen Prozessen wie z.B. Sepsis eine zentrale Rolle ein, da hier durch das Zytokin eine Akute-Phase-Reaktion ausgelöst wird. Seine Wirkung entfaltet das Zytokin nach Binden an den IL-6 Rezeptor (IL-6R).

## 2.5 Der Interleukin-6 Rezeptor

Bei der klassischen Signalabfolge bindet IL-6 an den membranständigen IL-6R, es entsteht der IL-6/IL-6R Komplex, welcher dann im Rahmen einer Signalkaskade zunächst über die Untereinheit *gp130* zur Aktivierung des Janus-Kinase/ signal transducer and activator of transcription (JAK/STAT)- Signaltransduktion führt. Hierbei handelt sich um die sogenannte klassische Signalabfolge [51]. Dieser membranständige IL-6R wird lediglich auf T-Zellen sowie Hepatozyten exprimiert. Hier zeigt sich die große Bedeutung dieses Zytokins für diese Zelltypen. Neben der beschriebenen klassischen Signalkaskade können weitere Zelltypen über den löslichen IL-6R aktiviert werden, nachdem IL-6 extrazellulär an diesen gebunden hat. Es entsteht ein Komplex aus beiden, welcher wiederum an *gp130* bindet und so andere Zelltypen für die IL-6-Wirkung sensibel macht, die sonst nicht durch IL-6 aktiviert werden könnten [52].

## 2.6 Ribonukleinsäure-Interferenz

Ribonukleinsäure-Interferenz (RNAi) wurde als Phänomen zunächst bei der Suche nach einer transgenen Petunie entdeckt und erstmals von *van der Krol* beschrieben [53]. Acht Jahre später konnte der zugrunde liegende Mechanismus von *Fire und Mello* in Nematoden aufgeklärt werden, indem sie doppelsträngige RNA (dsRNA) in *Caenorabditis elegans* spritzten und so die Genexpression hemmten [54]

Bei der RNAi verwendet die Zelle RNA-Fragmente, um zum Beispiel die Proteinexpression durch die messenger RNA (mRNA) zu hemmen. Man spricht vom „posttranscriptional gene-silencing“. In der Zelle ist dieser Mechanismus für zwei Vorgänge wichtig: zum einen für die endogene Regulation der mRNA-Translation und zum anderen, um die Zelle vor dem Eindringen von Viren und Transposons zu schützen. Das Prinzip der RNAi beruht auf dem Spalten einer dsRNA in Fragmente von 21-25 Nukleotiden durch eine Doppelstrang-RNase, den so genannten „Dicer“ [55].

Die bei der Spaltung entstandenen Fragmente sorgen dann für die Interferenz mit der mRNA und werden dementsprechend als „small interfering RNA“ (siRNA) bezeichnet. Die siRNA verbindet sich mit bestimmten Proteinen zum Ribonukleotid-Protein-Komplex. Dieser Komplex öffnet unter Abspaltung von Adenosintriphosphat (ATP) den

siRNA - Doppelstrang und überführt ihn in eine aktive Form den „RNA induced silencing complex“ (RISC) [56]. Dieser sucht dann nach der Ziel-mRNA, bindet an diese und zerschneidet sie mittels RNasen genau in der Mitte [57]. Die daraus resultierende Instabilität der Ziel-RNA führt dazu, dass sie dann durch zytoplasmatische RNasen weiter abgebaut wird, und es nicht zur Expression des kodierten Proteins kommen kann. Der durch die siRNA erzielte Effekt der Hemmung der Genexpression ist ausgesprochen wirksam und lang anhaltend. Der Mechanismus ist zusammenfassend in Abbildung 5 dargestellt.

siRNAs gelten als äußerst effektiv in der Suppression der Ziel-mRNA und der daraus hervorgehenden Proteine, eine Hemmung bis unter die Nachweisgrenze ist möglich [58].

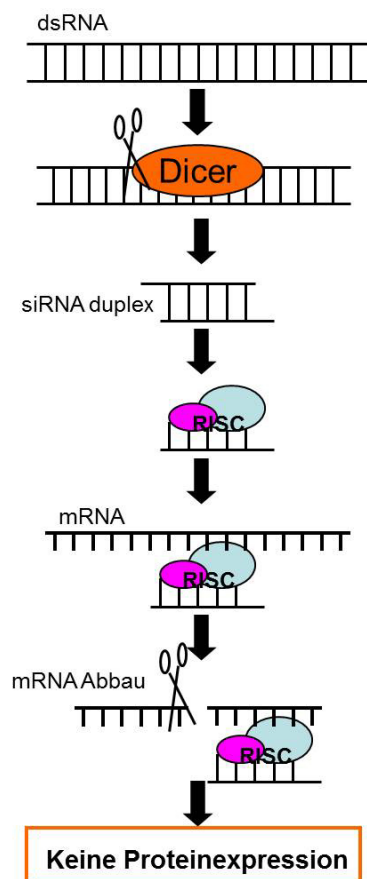


Abbildung 5: Wirkmechanismus der RNA-Interferenz

Die dsRNA wird mit Hilfe des Dimer, einer Nuklease, zu 21-25 langen Nukleotid-Fragmenten gespalten. Diese Fragmente werden als small interfering RNA (siRNA) bezeichnet. Es folgt die Überführung in den aktiven RISC-Komplex. Nach Anlagerung des Antisense-Stranges an die Ziel-mRNA kommt es zum Abbau durch den RISC-Komplex.

### **2.7 Elektroporation**

Bei der Elektroporation wird ein elektrisches Feld an eine Zelle angelegt. Dies führt zu einer reversiblen Öffnung der Zellmembran. Durch diese vorübergehend permeabilisierte Zellmembran können eine Vielzahl verschiedener Moleküle entweder durch Diffusion oder durch elektrophoretisch unterstützte Prozesse in das Zellinnere gelangen [59]. Basierend auf theoretischen Überlegungen und Experimenten mit Doppellipidmembranen wurde 1982 der erste erfolgreiche Gentransfer in Mauszellen beschrieben [60]. Im Laufe der letzten zwanzig Jahre wurde das Verfahren nach und nach verbessert und von besonderer Bedeutung sind inzwischen Geräte, die mit einem Rechteckimpuls arbeiten. Bei dieser Form der Elektroporation können die Höhe und Länge des Impulses unabhängig voneinander verändert werden, was für die Optimierung des Verfahrens eine herausragende Rolle spielt.

Es entsteht ein schonenderes Verfahren durch Minimierung der Erwärmung der Zellsuspension da die Impulslänge reduziert wird bei Verlängerung der Hochspannungsphase, welche für die Transfektion von größter Bedeutung ist. Es konnten mit diesem Verfahren deutlich bessere Transfektionseffizienzen erreicht werden [61].

### **2.8 Hinleitung zum Thema**

Neben der klassischen Genetik, die sich mit der Weitergabe bestimmter Merkmale an die nächste Generation und der damit einhergehenden Beschäftigung mit der DNA-Sequenz und ihrer Veränderung z.B. durch Mutation beschäftigt ist in den letzten Jahren die Epigenetik in den Fokus gerückt.

Bei der Epigenetik liegt das Augenmerk auf den nachträglichen Veränderungen auf Transkriptionsebene, ohne dass die DNA-Sequenz tatsächlich verändert wird. Diese Veränderungen entscheiden letztendlich, ob eine vorhandene genetische Information, die in der DNA-Sequenz eingebettet ist tatsächlich exprimiert wird. Ein Teil dieser epigenetischen Prozesse wird über die Modifizierung des Histons erreicht. Die kondensierte Form der DNA liegt im Zellkern als Chromatin vor. Dieses Chromatin ist um basische Proteine, die Histone (Histonproteine H2A, H2B, H3 und H4) gewickelt. Gemeinsam mit dem Chromatin bilden sie das Nukleosom.

An den Histonenden besteht die Möglichkeit zur Modifizierung z.B. durch Azetylierung oder Deazetylierung. Histonazetylierung führt zu einer vermehrten Transkription

während die Deazetylierung die Transkription hemmt. Durch Histon-Deazetylase-Inhibitoren (HDACi) kann dieser Prozess inhibiert werden. Die HDACi sind seit längerer Zeit sowohl für ihre anti-proliferativen als auch pro-apoptischen Eigenschaften bekannt [17, 62]. Zusätzlich zu diesen Charakteristika konnte in den letzten fünfzehn Jahren von verschiedenen Gruppen eine anti-entzündliche Wirkung der HDACi nachgewiesen werden, so unter anderem in verschiedenen Modellen experimenteller Kolitis [22, 63].

In der vorliegenden Arbeit sollte eine mögliche mechanistische Erklärung für die *in vivo* gezeigte anti-entzündliche Wirkung des Inhibitors gefunden werden. So wurde die Wirkung des HDACi ITF2357 auf die Ausschüttung pro-entzündlicher Zytokine in CD4<sup>+</sup>-T-Zellen beispielhaft an IFN $\gamma$  untersucht.

Weiterhin war von Interesse, ob auch die Polarisation von naiven T-Zellen durch ITF2357 gehemmt werden kann. Diesen Gedanken weiter verfolgend wurde auf der Suche einer mechanistischen Erklärung der anti-entzündlichen Effekte der Einfluss des Inhibitors auf den IL-6R untersucht, da IL-6 das entscheidende Zytokin für die Polarisation von Th17-Zellen darstellt, welche eine Schlüsselrolle in der Entstehung von Autoimmunerkrankungen einnehmen.

Da die einzelnen HDAC für sehr unterschiedliche Prozesse verantwortlich sind, wurden um die Spezifität des therapeutischen Ansatzes von HDACi z.B. in der Therapie von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen bei möglichst kleinem Nebenwirkungsspektrum zu verbessern, in einem zweiten Abschnitt der Arbeit durch Einsatz der siRNA-Technologie einzelne HDAC charakterisiert, die für die Vermittlung entzündlicher Prozesse verantwortlich sind.



### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Mäuse

DO11.10 Transgen für den  $\alpha/\beta$ -TZR der T-Zell-Hybridomlinie DO11.10, welcher für das Peptid (323-339) des Ovalbumin-Proteins spezifisch ist. Das Peptid wird gebunden am MHC-Klasse II Molekül-I-A<sup>d</sup> erkannt. Die Mäuse werden auf dem BALB/c-Hintergrund gehalten.

BALB/c Wildtyp

Alle verwendeten Mäuse wurden vom Bundesinstitut für Risikobewertung bezogen und unter pathogenfreien Bedingungen in den Räumlichkeiten der Forschungseinrichtungen für experimentelle Medizin am Campus Benjamin Franklin der Charité gehalten. Die Verwendung der Tiere wurde im Rahmen der Tötungsanzeige „Wirkung Histone-Deazetylase-Inhibitoren“ T024904 vom Landesamt für Gesundheit und Soziales in Berlin genehmigt.

#### 3.2 Chemikalien und Enzyme

Rinder-Serum Albumin (BSA)	PAA (Cölbe, Deutschland)
Concanavalin (ConA)	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Deoxynukleotid-Triphosphat (dNTP)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
DNase I	Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, USA)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma Aldrich
Fötale Kälberserum (FCS)	Linaris Biologische Produkte (Bettingen, Deutschland)
Ionomycin	Sigma Aldrich
4-[6-(Diethylaminomethyl)-Naphth-2-ylmethoxy-carbamoyl]-benzohydroxyamic hydrochloride (ITF2357)	Italfarmaco (Mailand, Italien)
Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (PBS)	PAA

Phorbol-12-Myristat-13-Azetat	Sigma Aldrich
Schwefelsäure	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Trypanblau	PAA
Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween-20)	Roth
Wasser (nukleasefrei)	Braun (Melsungen, Deutschland)
RPMI 1640	PAA
Streptomycin	PAA
Penicillin	PAA

### 3.3 Puffer und Medien

sterile Puffer und Medien für die Zellkultur

Erythrozytenlysepuffer	1 g/l $\text{KCHO}_3$ 8,9 g/l $\text{NH}_4\text{Cl}$ 38 mg/l EDTA pH 7,5
PBS	8,0 g/l NaCl 0,2 g/l KCL 1,15 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0,2 g/l $\text{KH}_2\text{PO}_4$
T-Zellmedium (TZM)	RPMI 1640 10% FCS hitzeinaktiviert 100 $\mu\text{l/ml}$ Streptomycin 100 U/ml Penicillin 2 mM L-Glutamin
Elektroporationspuffer	siPORT Ambion/Applied Bioscience (Darmstadt, Deutschland)
siRNA Suspensionspuffer	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Puffer für ELISA	
Bindungspuffer	Carbonat-Puffer, pH 9,5
Blockpuffer	Assay Diluent (PBS+10% FCS)
Tetramethylbenzidin (TMB)-Puffer	0,2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

0,1 M Zitronensäure

Puffer für Umschreibung in cDNA

5x *first strand* Puffer

Qiagen

Lyse Puffer für CHIP

1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris  
(pH 8.1)

MACS Puffer

450 ml PBS  
50 ml BSA 5 %  
+/- 2mM EDTA

### 3.4 MACS („magnetic-activated cell sorting) Beads und Säulen für Zellsortierungen

Sämtliche, für Sortierungen muriner Zellen verwendete Produkte wurden von der Firma Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach, Deutschland) bezogen und laut Herstellerangaben verwendet.

MACS-Beads: CD4, CD62L, CD90, anti-FITC Multisort-Kit,

Säulen mit passendem Magneten: LS<sup>+</sup>

### 3.5 Kits

RNeasy Mini Kit

Qiagen

IFN $\gamma$  ELISA Kit

BD Bioscience

### 3.6 Antikörper

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Antikörper. Herkunft der Isotypen: Armenischer Hamster (Ar.H.), Hase (Rb), Maus (M), Ratte (R), Ziege (G).

<i>Antigen</i>	<i>Klon</i>	<i>Markierung</i>	<i>Isotyp</i>	<i>Herkunft</i>
<b>T-</b>				

## Material und Methoden

---

<b>Zellisolation</b>				
CD4	GK 1.5	FITC	R.IgG2a, κ	BD Biosciences
CD62L	MEL-14	PE	R.IgG2a, κ	BD Biosciences
Intrazelluläre Zytokin-färbung				
IFN $\gamma$	XMG1.2	Allophycocyanin	R.IgG1, κ	BD Biosciences
IL-4	11B11	PE	R.IgG1, κ	
<b>T-Zell-Stimulation</b>				
CD28	31.51		Ar.H.IgG1, I	Charité Berlin
CD3	145-2C11		Ar.H.IgG1, κ	Charité Berlin
<b>T-Zell-Polarisierung</b>				
IFN $\gamma$	AN18.17.24		R.IgG	Deutsches Rheumaforschungszentrum (DRFZ), Berlin
IL-12	C17.8		R.IgG	DRFZ
IL-4	11B11		G.IgG2b, κ	DRFZ
<b>MACS</b>				
FITC micro beads				Miltenyi Biotec
CD62L micro beads				Miltenyi Biotec
<b>ChIP</b>				
Anti-Azetyl-Histon 3 Antikörper (Lys9)				Cell Signaling (Danvers, USA)
Protein A micro beads				Miltenyi Biotec

### 3.7 Synthetisches Peptid

Bei OVA<sub>323-339</sub> handelt es sich um ein 17mer Peptid (323-339) des Ovalbumin-Proteins aus Hühnereiweiß. OVA<sub>323-339</sub> besitzt ein Molekulargewicht von 2062 Da und hat folgende Aminosäure-Sequenz (Standard IUPAC-Einbuchstaben-Code):

323 339  
 I S Q A V H A A H E I N E A G R

Herkunft: Institut für Biochemie der Charité

### 3.8 Geräte

Begasungsbrutschrank	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Homogenisator	Bandelin (Berlin, Deutschland)
ELISA-Reader	Tecan Spectra Mini (Crailsheim, Deutschland)
FACSCalibur	BD Bioscience
Heizblock	Eppendorf Thermomixer (Hamburg, Deutschland)
Kühlschränke und Gefrierschränke	Liebherr (Biberach an der Riss, Deutschland)
Lightcycler	Roche
Mikroskop	Krüss (Hamburg, Deutschland)
Sterilbank	Heraeus
Thermocycler	Biometra T3000 (Göttingen, Deutschland)
Zentrifugen	Heraeus, Fresco 21 Eppendorf Zentrifuge 5810R

### 3.9 Verbrauchsmaterialien

Pasteur-Pipetten	Roth
48-, 24-, 6-Loch Zellkulturplatten	Nunc (Roskilde, Dänemark)
5-, 10- und 25 ml-Einmal-Pipetten	BD Falcon
15 ml- und 50 ml- Polypropylen-	Sarsted AG&Co. (Nümbrecht,

Zentrifugenröhrchen	Deutschland)
Lightcycler Kapillaren	Roche (Mannheim, Deutschland)
Zellsieb (70 µm Nylon)	BD Falcon
4 ml FACS Röhrchen	BD Falcon
Kanülen, Spritzen	BD Bioscience

### **3.10 Tötung und Organentnahme**

Getötet wurden die Tiere durch zervikale Dislokation in CO<sub>2</sub>-Narkose. Anschließend wurde das Fell mit 70% Ethanol desinfiziert und mit einer Schere ein medianer Schnitt auf der Bauchdecke vorgenommen. Es folgte die Entnahme der mandibulären, der zervikalen, der axialen sowie der inguinalen Lymphknoten mit Hilfe einer desinfizierten Pinzette. Danach wurde mit Hilfe einer Schere das Peritoneum eröffnet, um auch die mesenterialen und paraaortalen Lymphknoten zu gewinnen. In einem letzten Schritt wurde auch die Milz entnommen. Die entnommenen Milzen und Lymphknoten wurden bis zur weiteren Aufarbeitung in PBS auf Eis gelagert.

#### **3.10.1 Zellisolation aus Lymphknoten und Milz**

Aus den verschiedenen Lymphknoten der Mäuse sowie aus deren Milzen wurde mit Hilfe eines Zellsieb (70 µm-Nylonfilters) und dem Stempel einer 2 ml Spritze eine Einzelzellsuspension hergestellt. Nach einmaligem Waschen wurde diese für 2 Min auf Eis in Erythrozyten-Lyse-Puffer inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift und Aufnahme der Zellen in PBS/BSA standen diese zur weiteren Aufarbeitung zur Verfügung.

#### **3.10.2 Sortieren von Zellen mit Hilfe von MACS**

Magnetische Zellsortierung (MACS – „magnetic activated cell sorting“) macht es möglich eine gewünschte Zellpopulation aus einer komplexen heterogenen Zellsuspension zu isolieren.

Die gewünschten Zellen wurden mit sogenannten „Micro-Beads“ inkubiert. Bei diesen „Beads“ handelt es sich um ca. 50 nm große magnetische Mikropartikel, an die

Antikörper gebunden sind. Die Antikörper erkennen Strukturen auf der Zelloberfläche und führen so zur spezifischen Bindung.

Die markierten Zellen werden in Suspension auf die Trennsäulen gegeben, die mit Kugeln gefüllt sind, die aus Eisenoxid umhüllt von Polysacchariden bestehen und sich in einem Höchstleistungsmagneten befinden. Zwischen den Eisenoxidkugeln, die außerhalb des Magneten nicht magnetisch sind, entsteht ein Hochgradientenfeld. Dieses Feld führt dazu, dass die markierten Zellen in der Säule festgehalten werden, während unmarkierte Zellen als Negativfraktion durch die Säule gespült und aufgefangen werden. Durch Spülen der Säule außerhalb des Magneten werden die mit Beads markierten Zellen gewonnen.

Die MACS-Beads wurden in der vom Hersteller angegebenen Verdünnung zur Einzelzellsuspension hinzugegeben und für 15 Min im Kühlschrank (6-10 °C) inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch einmal mit gekühltem MACS-Puffer gewaschen, resuspendiert und dann in  $1 \times 10^8$  Zellen/500  $\mu$ l MACS-Puffer wieder aufgenommen und über eine geeignete MACS-Säule gegeben. Jeder Waschschritt erfolgte in einer Kühlzentrifuge bei 4 °C für 7 Min bei 400 g. Um die Reinheit der Sortierung zu überprüfen, wurden jeweils vor und nach der Separierung Proben entnommen und durchflusszytometrisch untersucht.

Es gibt die Möglichkeit zur Positiv- und die zur Negativ-Sortierung. Bei der Positiv-Sortierung werden die Zellen, die das gewünschte Antigen exprimieren markiert, binden an die Säule und werden als Positivfraktion gewonnen.

Bei der Negativ-Sortierung (Depletion) werden Beads zur Markierung verwendet, die einen Antikörper gebunden haben, bei dem sich das korrespondierende Antigen genau auf den Zellen befindet, die nicht von Interesse sind. Nachdem die Zellsuspension auf die Säule gegeben wurde, binden die markierten Zellen an die Säule und die Fraktion, die durch die Säule hindurch läuft, enthält nunmehr die Zielzellen. Bei der Depletion erhält man im Vergleich zur Positivselektion zwar eine geringere Reinheit der Zielzellpopulation, von Vorteil ist jedoch, dass diese Zellen bei der Sortierung unberührt bleiben. Durch diese Technik soll die Wahrscheinlichkeit der Aktivierung der Zielzellen durch mechanische Manipulation verringert werden.

### **3.10.3 Isolation CD4<sup>+</sup>-Zellen**

Nach Herstellung einer Einzelzellsuspension aus Milzen und Lymphknoten wurden die Zellen mit CD4<sup>+</sup>-Beads markiert und über eine Säule aufgetrennt. Die dabei sortierten CD4<sup>+</sup>-Zellen hatten immer eine Reinheit von mindestens 98%.

### **3.10.4 Isolation naiver T-Zellen**

Für die Isolierung von naiven Th-Zellen wurde die Sortierung in zwei Teilschritten mit Hilfe des anti-FITC-Multisort-Kit vorgenommen. Im ersten Schritt wurden CD4<sup>+</sup>-Zellen isoliert, aus diesen wurde in einem zweiten Schritt CD62L<sup>+</sup>-Zellen gewonnen.

Zunächst wurde die Zellsuspension für 10 Min auf Eis mit anti-CD4-FITC inkubiert, anschließend gewaschen und danach mit anti-FITC-Beads markiert. Es folgte die Aufreinigung über eine Trennsäule. Danach wurde durchflusszytometrisch die Reinheit der CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation überprüft. Bei einer Population von über 98% CD4<sup>+</sup>-Zellen konnte die Isolierung naiver Th-Zellen fortgesetzt werden; bei Ergebnissen unter dieser Marke fand eine weitere Aufreinigung über eine zweite Trennsäule statt.

Mit einem im anti-FITC Multisort-Kit enthaltenen „MultiSort Release Reagent“, das in einem Verhältnis von 1:50 eingesetzt wurde, erfolgte die Lösung der Beads von den Zellen, und durch den Einsatz einer weiteren Säule wurden freie Beads und weiterhin markierte Zellen abgetrennt (Depletion). Im nächsten Schritt wurden die Zellen mit anti-CD62L-Beads markiert und wiederum über eine Säule aufgetrennt. Am Ende dieser Aufreinigung lag eine Reinheit von mindestens 98% CD4/CD62L doppelt-positiver Zellen vor.

### **3.10.5 Isolation von Antigen-präsentierenden Zellen**

Die für die Stimulation benötigten APZ wurden aus Splenozyten von BALB/c-Mäusen durch Depletion mit CD90-MACS-Beads und Auftrennen über eine Säule isoliert. Die Reinheit der T-Zell-depletierten APZ lag immer bei ca. 98%.



### **3.10.6 *In vitro*-Kultur muriner T-Zellen**

Bei der Kultivierung von Zellen in der Zellkultur sind bestimmte Verhaltensweisen erforderlich, um eine Kontamination der Kulturen mit Pilzen, Bakterien, Viren und Mykoplasmen zu vermeiden. Steriles Arbeiten kann nur gewährleistet werden, wenn grundsätzlich an sterilen Werkbänken gearbeitet wird. Die Keimfreiheit dieser Arbeitsplätze wird durch regelmäßige UV-Bestrahlung und Flächendesinfektion erreicht. Alle Geräte, Puffer und Medien wurden autoklaviert, steril filtriert oder in sterilem Zustand erworben.

Um die Proliferation der Zellen in der Zellkultur sicherzustellen, ist es wichtig, dass ein ausreichendes Nährstoffangebot vorhanden ist und dass die Umweltbedingungen konstant optimal gehalten werden. Die Aufrechterhaltung der optimalen äußeren Bedingungen (37 °C; 5% CO<sub>2</sub>; 95% Luftfeuchtigkeit) wird durch einen geeigneten Brutschrank gewährleistet. Das Nährstoffangebot wird durch ein entsprechendes TZM reguliert. Dieses basiert auf einem synthetischen Grundmedium (RPMI 1640), welches ein Hydrogencarbonat-Puffersystem benutzt und aus einer Lösung von Salzen, Vitaminen, Glukose und Aminosäuren besteht. Als pH-Wert-Indikator ist Phenolrot zugesetzt.

Um die murinen Zellen mit Wachstumsfaktoren und Hormonen zu versorgen, wird dem Medium FCS zugesetzt. Zur Vermeidung einer Bakterienkontamination wurden die Antibiotika Penicillin (100 U/m) und Streptomycin (100 µg/ml) zugesetzt. Zur Optimierung des Mediums wurde β-Mercaptoethanol zugegeben. Um ein dauerhaft gutes Gedeihen der Zellen zu gewährleisten, wurden diese regelmäßig expandiert und mit frischem Medium versorgt.

### **3.10.7 Stimulation der Zellen**

Die in den Versuchen verwendeten T-Zellen wurden auf drei verschiedene Arten stimuliert. Zum einen wurden sie durch polyklonale Aktivierung mit Hilfe von anti-CD3- und anti-CD28-Antikörper aktiviert, oder sie wurden durch die Aktivierung OVA-TZR-transgener Th-Zellen aus DO11.10-Mäusen mit APZ und dem spezifischen Antigen (OVA-Peptid) stimuliert. Die dritte Form der Stimulation erfolgte durch Zugabe des Lektins ConA.

### **3.10.8 Behandlung und Einsatz der Antigen-präsentierenden Zellen**

Nach Isolation von naiven CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup>-T-Zellen aus Milzen und Lymphknoten von transgenen DO11.10 Mäusen wurden diese mit Mitomycin (2 mg/ml) behandelten APZ aus BALB/c Mäusen und dem spezifischen OVA-Antigen stimuliert. Das OVA-Peptid wurde in einer Konzentration von 1 mg/ml eingesetzt. Die Konzentration des Mitomycins ist so gewählt, dass die APZ noch in der Lage sind Antigen zu präsentieren, ihre Fähigkeit zur Teilung jedoch verloren haben und nach einigen Tagen absterben. Die APZ wurden in einer Ratio von 1:3 zu T-Helferzellen eingesetzt und in einer Gesamtkonzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml in TZM mit polarisierenden Zusätzen auf eine geeignete Zellkulturplatte gegeben.

### **3.10.9 Polarisierung der Th-Zellen**

Um für die weiterführenden Versuche Th1-Zellen zu erhalten, wurden die Zellen unter Zugabe von IL-12 (20 ng/ml) und anti-IL-4-Antikörpern (10 µg/ml) stimuliert. Für Th2-Zellen wurde entsprechend IL-4 (30 ng/ml), anti-IL-12- und anti-IFN $\gamma$ -Antikörper (je 5 µg/ml) zugegeben.

### **3.10.10 Stimulation der CD4<sup>+</sup>-Zellen mit CD3/CD28**

Nach Isolation von CD4<sup>+</sup>-Zellen aus Milzen von BALB/c-Mäusen wurden diese polyklonal stimuliert. Dafür wurde eine Zellkulturplatte über Nacht bei 4°C mit anti-CD3 (10 µg/ml) und anti-CD28 (10 µg/ml) Antikörper in PBS beschichtet. Bevor die Zellen am nächsten Tag in einer Konzentration von ca.  $3 \times 10^6$  Zellen/ml in TZM auf die Platte gegeben wurden, erfolgte ein dreimaliges Waschen der Platte mit PBS.

### **3.10.11 Stimulation der mit dem Histon-Deazetylase-Inhibitor ITF2357 behandelten CD4<sup>+</sup>-Zellen mit ConA**

Frisch isolierte CD4<sup>+</sup>-Zellen in TZM wurden zu je  $3 \times 10^6$  Zellen pro Reaktionsraum („well“) auf eine 48-Loch(well)-Platte gegeben. Danach wurde ITF2357 in verschiedenen Konzentrationen von 0 bis 500 nM zu den Zellen gegeben. Nach

einer Stunde bei 37 °C wurden die Zellen mit ConA (5 µg/ml) stimuliert. Nach weiteren 24 h wurden die Überstände abgenommen und bei -20 °C bis zu der Auswertung mittels ELISA gelagert.

### **3.10.12 Behandlung der naiven CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>-Zellen mit dem Histon-Deazetylase-Inhibitor ITF2357 unter Th1 polarisierenden Bedingungen**

Frisch isolierte naive CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>-Zellen wurden zu je 3x10<sup>6</sup> Zellen pro „well“ auf eine 48-Loch-Platte gegeben. Danach wurde ITF2357 in verschiedenen Konzentrationen von 0 bis 500 nM zu den Zellen gegeben und diese bei 37 °C eine Stunde präinkubiert. Dann wurden die Zellen in Anwesenheit von IL-12- (20 ng/ml) und anti-IL-4- (10 µg/ml) Antikörpern stimuliert, um Th1-polarisierte Zellen zu erhalten. Die Stimulation der Zellen fand hier über die aus BALB/c isolierten APZ statt. Nach 48 h im Brutschrank bei 37 °C wurden auch hier Überstände für spätere ELISA-Messungen abgenommen und bei -20 °C aufbewahrt.

### **3.11 Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie ermöglicht es, eine heterogene Mischung von Zellen aufgrund ihrer Lichtstreuungseigenschaften sowie der emittierten Fluoreszenzstrahlung zu unterscheiden und zu trennen. Hierbei passieren die Zellen einen fokussierten Laserstrahl. Das Licht, welches hinter dem Laserstrahl gestreut wird, wird als so genanntes Vorwärtsstreulicht („forward scatter“, FSC) gemessen. Bei dem seitlich vom Strahl gemessenen Licht handelt es sich um das Seitenstreulicht („sideward scatter“, SSC) und das emittierte Fluoreszenzlicht der Antikörper-Fluoreszenz-Konjugate. Die Intensität des Vorwärtsstreulichts entspricht annähernd der Zellgröße. Das Seitwärtsstreulicht ist ein Maß für die Brechung des Lichts und gibt so Auskunft über die Granularität der Zelle, einschließlich Größe und Struktur des Zellkerns. Die Messungen des emittierten Fluoreszenzlichts beruhen auf der Kopplung von Zellen an bestimmte Fluoreszenzfarbstoffe. Diese Farbstoffe binden entweder an bestimmte Bestandteile der Zellen oder man verwendet Antikörper, die sich gegen bestimmte Oberflächenproteine der Zellen richten. Während der Messung passiert jede Zelle den fokussierten Laser einzeln. Dann

werden Streulicht- und Fluoreszenzsignale durch Filtersysteme auf die verschiedenen Photoverstärkerröhren geleitet. Über einen angeschlossenen Computer werden die Messdaten verarbeitet und können nach der Messung analysiert werden.

### **3.11.1 Intrazelluläre Färbung**

Vor der intrazellulären Färbung wurden die Zellen zunächst für 2 h mit 5 ng/ml PMA und 1 µg/ml Ionomycin unspezifisch stimuliert. PMA ist ein Phorbolster, welcher die Protein-Kinase C (PKC) stimuliert. Ionomycin ist ein Ionophor, das wegen seines hydrophoben Außenbereichs die Lipiddoppelschicht der Zellmembran durchdringen kann und so den zytosolischen Calciumspiegel erhöht. Die an der Proliferationsregulation beteiligte PKC wird durch  $\text{Ca}^{2+}$  reguliert. Sowohl PMA als auch Ionomycin beeinflussen also die PKC und die Zellen werden aktiviert. Im darauf folgenden Schritt wurde Monensin zugegeben, ein Protein-Transporthemmer, der eine Akkumulation der neu produzierten Zytokine im Golgi-Apparat bewirkt. Nach weiteren zwei Stunden Inkubationszeit wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit Formalin (3,7%) für fünf Minuten (Min.) bei 37 °C fixiert. Durch zweimaliges Waschen mit PBS/BSA wurde die Fixierung gestoppt. Um die Membran für die Antikörper durchgängig zu machen, wurde gemeinsam mit dem Antikörper Saponin zu den Zellen gegeben. Saponin ist ein Wirkstoff aus Pflanzen, der in der Lage ist Poren in der Zellmembran zu eröffnen.

Die Zellen wurden mit den entsprechenden Detektionsantikörpern in Saponinpuffer für 25 Min im Dunkeln markiert und anschließend zweimal mit Saponinpuffer und einmal mit MACS-Puffer gewaschen.

Danach wurden die Zellen in MACS-Puffer aufgenommen und am Durchflusszytometer analysiert.

### **3.11.2 Färbung mit Propidiumiodid**

Zur Differenzierung der lebenden von toten Zellen erfolgte die Zugabe von Propidiumiodid (PI).

Lebende Zellen besitzen eine intakte Zellmembran, diese ist für einen kationischen Farbstoff wie PI oder Trypanblau nicht durchlässig. Kommt es zum Zellsterben,

rupturiert auch die Zellmembran, so dass der entsprechende Farbstoff in die Zelle eindringen, an die DNA binden und später im Durchflusszytometer gemessen werden kann [64]. Entscheidend ist eine kurze Anfärbezeit von ca. 5-10 Min. In dieser Zeitspanne nehmen die toten Zellen PI vollständig auf, während die lebenden Zellen eine kaum messbare Menge aufnehmen [65].

### **3.12 Enzymgekoppelter Immunsorptionsstest (ELISA)**

Ein ELISA bietet die Möglichkeit beliebige Proteine mit Hilfe einer Antigen-Antikörper-Reaktion in einer Probe zu detektieren. Beim ELISA wird das zu bestimmende Antigen an die Oberfläche einer speziellen 96-Wellplatte gebunden. Jeweils vor der Zugabe einer neuen Substanz wurde die Platte fünfmal mit Waschpuffer (PBS-T) gewaschen und auf Papier ausgeklopft. Unspezifische Bindungen wurden durch Zugabe von 100 µl Verdünnungspuffer (PBS mit 10% FCS) für 30 Min. bei Raumtemperatur blockiert.

Danach wurde eine Standardreihe aus sieben Verdünnungsschritten in Verdünnungspuffer und jeweils 100 µl Probe als Doppelbestimmung in einer Verdünnung von 1:10 aufgetragen und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Im nächsten Schritt wurde gemeinsam mit einem biotinylierten anti-Maus-Ig-Antikörper als Detektions-Antikörper ein Enzym, die Avidin-Meerrettichperoxidase zugegeben. Es folgte eine einstündige Inkubation.

Dieser zweite Antikörper bindet ebenfalls an das Antigen und es entsteht ein Antikörper-Antigen-Antikörper Komplex. Nach Auswaschen des überschüssigen zweiten Antikörpers wurde ein Substrat aus Tetramethylbenzidin (TMB) und Wasserstoffperoxid hergestellt und zugegeben. Die Peroxidase setzt ihr Substrat in Anwesenheit von einem Elektronendonator hier TMB in Wasser um, was zur Oxidation des Elektronendonors führt. Das Oxidationsprodukt bildet eine blaue Substanz.

Die Farbintensität ist proportional zur Peroxidase-Konzentration und dementsprechend proportional zur Anzahl der an die Antikörper gebundenen Proteinmoleküle. Nach zehn Min wurde die Oxidation des Substrats durch Zugabe einer Stopplösung (Schwefelsäure 5%) beendet. Diese bewirkte einen Farbumschlag von blau nach gelb. Anschließend wurde die Extinktion bei 450 nm in einem ELISA-Messgerät gemessen.

### 3.13 RNA-Interferenz

RNA-Interferenz (RNAi) ist eine Methode, die eine Funktionszuordnung einzelner Proteinen in einer Zelle möglich macht. Hierbei wird „small interfering RNA“ (siRNA) eingesetzt, die die Expression eines bestimmten Proteins unterdrückt und z.B. durch Elektroporation in die Zelle gebracht werden kann. Der Einsatz von siRNA führt zur Unterdrückung desjenigen Proteins, das durch diese RNA kodiert wird.

Die siRNA gegen die HDAC1-11, zusammenfassend dargestellt in Tabelle 2, wurden von Qiagen bezogen und nach Herstellerangaben in 250 µl des mitgelieferten Puffers (siRNA Suspension Buffer) zu einer Lösung der Konzentration 20µM gelöst. Anschließend wurde die Lösung aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten siRNA-Sequenzen

Gen	Gene Accession Number	Sense	Antisense
HDAC 1	NM_008228	r(CUA CAA UGA CUA CUU UGA A)dTdT	r(UUC AAA GUA GUC AUU GUA G)dGdG
HDAC 2	NM_008229	r(CCA AUG AGU UGC CAU AUA A)dTdT	r(UUA UAU GGC AAC UCA UUG G)dGdA
HDAC 3	NM_010411	r(AGA AGA UGA UCG UCU UCA A)dTdT	R(UUG AAG ACG AUC AUC UUC U)dTdA
HDAC3_2	NM_010411	r(AUA UGU GGU UCU AGA AUU A)dTdT	r(UAA UUC UAG AAC CAC AUA A)dGdG
HDAC 4	NM_207225	r(GGC GUG GGU UUC AAU GUC A)dTdT	r(UGA CAU UGA AAC CCA CGC C)dTdG
HDAC 5	NM_010412	r(GCA UGA GGA CGG UGG GUA A)dTdT	r(UUA CCC ACC GUC CUC AUG C)dTdG
HDAC 5_2	NM_001077696	r(GCC UCG GAA CCC AAC UUA A)dTdT	r(UUA AGU UGG GUU CCG AGG C) dCdG
HDAC 6	NM_010413	r(GGC CAA GAU UCU ACU A)dTdT	r(UAG UAG AAG AAU CUU GGC C)dGdG
HDAC 6_2	NM_010413	r(GGA UGA CCC UAG UGU AUU A) dTdT	r(UAA UAC ACU AGG GUC AUC C)dTdC
HDAC 7a_6	NM_019572	r(CGG UGA UGC UGA AAC ACC A) dTdT	r(UGG UGU UUC AGC AUC ACC G)dAdG
HDAC 7a_2	NM_019572	r(CGA CCU UGC CUU CAA AGU A)dTdT	r(UAC UUU GAA GGC AAG GUC G)dGdT
HDAC 8	NM_027382	r(CAC UGA UGC CUA UCU GCA A)dTdT	r(UUG CAG AUA GGC AUC AGU G)dTdG
HDAC 9_6	NM_024124	r(GGU AAU AGG CAA AGA UUU A)dTdT	r(UAA AUC UUU GCC UAU UAC C)dTdG
HDAC 10	NM_199198	r(GCU GGU CGA UGC UGU GCU A)dTdT	r(UAG CAC AGC AUC GAC CAG C)dTdG
HDAC11_1	NM_144919	r(CGG UCA UCU UUC UUC CCA A)dTdT	r(UUG GGA AGA AAG AUG ACC G)dGdG
HDAC 11_2	NM_144919	r(CGU UUG GGA UGA GUG UUU A)dTdT	r(UAA ACA CUC AUC CCA AAC G)dTdG
IFN $\gamma$	K00089	r(GAG UGA AUU CCU AUU AAU A)dTdT	r(UAU UAA UAG GAA UUC ACU C )dTdT
Negativ		UUC UCC GAA CGU GUC	ACG UGA CAC GUU CGG

(Kontrolle) siRNA		ACG UdT dT	AGA AdT dT
----------------------	--	------------	------------

### 3.14 Elektroporation

Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes an eine Zelle kann eine vorübergehende, reversible Öffnung der Zellmembran herbeigeführt werden durch welche die siRNA in die Zelle diffundieren kann. Bei der Elektroporation werden kurze Hochspannungsimpulse genutzt, um die Zellmembran zu passieren. Durch die Anlage eines elektrischen Feldes, welches gerade die Kapazität der Zellmembran überschreitet, kann ein vorübergehender, reversibler Zusammenbruch der Zellmembran erreicht werden. Es ist hierbei wichtig, die für den zu untersuchenden Zelltyp idealen Bedingungen zu finden, um die bestmögliche Transfektion der Zellen zu erreichen, ohne dabei große Verluste bei der Zellzahl zu erzeugen (Transfektionseffizienz). Die entscheidenden zwei Parameter sind hierbei sowohl Länge (Mikrosekunden,  $\mu\text{s}$ ) als auch Stärke (Volt, V) des elektrischen Impulses.

Bei allen hier transfizierten Zellen handelte es sich um, wie unter 2.10.2 beschrieben, frisch isolierte CD4<sup>+</sup>-Zellen. Pro Elektroporationsansatz wurden  $2 \times 10^6$  Zellen verwendet. Zwischen Isolation und dem Beginn der Elektroporation waren die Zellen durchgängig auf Eis gelagert, wurden dann für 4 Min. bei 2000 g bei Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand verworfen und das entstandene Zellpellet mit Elektroporationspuffer resuspendiert. Nach Überführung der Zellen in eine entsprechende Küvette und Zugabe von 6  $\mu\text{l}$  siRNA fand die Elektroporation bei 500 V und 400  $\mu\text{s}$  statt. Danach wurden die Zellen noch 1 Min unberührt gelassen und anschließend in eine mit 37 °C warmen TZM gefüllten 48-Loch Platte überführt. Vor der Stimulation der Zellen mit ConA wurden sie eine Stunde unstimuliert bei 37 °C im Brutschrank belassen.

Nach 24 Stunden wurden die Zellen in 350  $\mu\text{l}$  RLT-Puffer aufgenommen und bei -80°C eingefroren.

### 3.14.1 Aufarbeitung der RNA

Zur Aufreinigung der durch die Lyse der Zellen mit RLT-Puffer gewonnenen RNA wurde das RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit (Qiagen) mit Säulen und DNase nach Herstellerprotokoll verwendet.

Das, wie in 2.10.1 beschrieben, gewonnene Zelllysate wurde im ersten Schritt mit 350 µl Ethanol gemischt was dazu führt, dass die RNA selektiv an die Membran der RNeasy Säule bindet. Es folgten mehrere Waschschrte und ein Verdau mit DNase (DNase I von Qiagen), um Verunreinigungen durch DNA zu verhindern. Im letzten Schritt wurde die gereinigte RNA mit 25 µl RNase freiem Wasser in ein Eppendorfgefäß eluiert.

### 3.14.2 Umschreiben in cDNA mit M-MLV RT

Um die RNA für Realtime-PCR-Analysen verwenden zu können, musste sie in stabilere cDNA umgeschrieben werden [66]. Dies erfolgte mit der reversen Transkriptase aus dem „moloney murine leukemia virus“ (M-MLV RT). Hierbei handelt es sich um eine RNA abhängige DNA-Polymerase, die besonders für lange RNA-Matrizen („template“) geeignet ist.

Vor Beginn der Umschreibung wurde zunächst ein DNA-Verdau durchgeführt, um verbliebene Verunreinigungen der RNA mit DNA zu beseitigen. Hierzu wurden 20 µl RNA mit 2,5 µl DNase I-Puffer und 2 µl DNase für 20 Min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von EDTA gestoppt. Es folgte das Umschreiben in cDNA mit folgendem Ansatz:

Oligo (dT) (500 µg/ml)	2,0 µl
RNA	27,5 µl (20µl RNA+DNase I-Verdau)
dNTP (10 nM)	4,0 µl
RNase freies Wasser	20,5 µl
5x "First-strand buffer"	16,0 µl
DTT	8,0 µl



RNaseOUT	1,0 µl
M-MLV RT	1,0 µl

1. 5 Min 65 °C Anlagern der Oligo(dT)
2. 2 Min 37 °C Vorheizen für die Reverse Transkriptase
3. 50 Min 37 °C Transkription
4. 15 Min 70 °C Inaktivieren der Reversen Transkriptase / DNase

Die so erhaltene cDNA wurde bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

### 3.14.3 Realtime-quantitative-PCR

Bei der Realtime-quantitativen-PCR (qPCR) handelt es sich um eine Methode, die die Quantifizierung der mRNA-Expressionshöhe möglich macht. In einem Schritt finden hier Amplifikation, PCR-Produkt-Detektion und -Quantifizierung statt. Dies erfolgt durch Messung der Fluoreszenz eines sich in die doppelsträngige DNA einlagernden Farbstoffes (Sybr Green). Hat Sybr Green an doppelsträngige DNA gebunden, entsteht ein DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplex, der blaues Licht bei einer Wellenlänge  $\lambda_{\max} = 494$  nm absorbiert und grünes Licht bei  $\lambda_{\max} = 521$  nm emittiert. Erhöht sich nun die Kopienzahl durch die Vervielfältigung innerhalb eines PCR-Zyklus, so steigt parallel die Leuchtintensität des Farbstoffes.

Hier wurde ein Platinum<sup>®</sup> SYBR<sup>®</sup> Green qPCR SuperMix-UDG von Invitrogen verwendet, welcher schon Zusätze wie 50 nM Magnesium Chlorid (MgCl<sub>2</sub>), ROX Reference Dye und 20x Rinder Serum Albumin enthält, sofort einsatzbereit ist und nur noch den Zusatz von Primern und der Probe benötigt. Das Design der einzelnen Primer für HDAC1-11 erfolgte mit IDT SciTools PrimerQuest<sup>SM</sup> (Integrated DNA Technologies-RTPrimer, USA). Bezogen wurden die Primer von TIB Molbiol (Berlin, Deutschland). Alle Primer waren auf eine optimale „Annealing“-Temperatur von 60 °C ausgerichtet.

Für die Lightcycler-PCR wurde folgender Ansatz pro 25 µL Endvolumen verwendet:

5,5 µl	ultrapures DNase/RNase freies Wasser
12,5 µl	Platinum SYBR-Green qPCR Super-Mix UDG

- 1 µl Forward Primer 5 µM  
 1 µl Reverse Primer 5 µM  
 1 µl „Rinder Serum Albumin“ 20x

Tabelle 4: Realtime-qPCR Primer

Gen	Primersequenz (5'-3')
HDAC 1	For ACC ATC AAA GGA CAC GCC AAg T Rev AAG TCC AGC AGC GAG CAA CAT T
HDAC 2	For GGG CTG TGA AAT TAA ACC GGC A Rev TTC GAG GAT GGC AAG CAC AA
HDAC 3	For AAT GAA ACC TCA TCG CCT GGC A Rev AGA ATG GAA GCG GCA CAT GTC A
HDAC 4	For ACT GCC CTT GGA ACC TGC ATT Rev ATG CAA CTG TGC CTC ATG CTG T
HDAC 5	For AGG TAA AGC TGA GGC TCC AGG AAT Rev AGG GCC CAA GCA AAG GCA AAG GCA ATT T
HDAC 6	For TGG ACA CCA TGC CTC AGC ACA AT Rev TGG ACA CCA TGC TCA GCA CAA T
HDAC 7	For TGT CAC CGA CCT TGC CTT CAA A Rev ATC TTG CTG GCT TTG CCG TGT T
HDAC 8	For ACG ATT GCG ACG GAA ATT TGA CCG Rev TGT GCA GGG ACA CAG TCA TAA CCT
HDAC 9	For AGG ATG ATG CCT GTG GTG GAT Rev GAG TTG TGC TTG ATG CTG CCT TGT
HDAC 10	For AAG GTG CCT GTG TTT GTC AGC TTG Rev AGT GAA AGG TGT CCG GGT GAA AGT
HDAC 11	For TCA AGT TCC TGT TTG AAC GCG TGG Rev TTG TCA CCC ATG AAG TCT CGC TCA
IFN <sub>γ</sub>	For TCT TCA GCA ACA GCA AGG CGA Rev CCC GAA TCA GCA GCG ACT CC
IL-6R	For

	CCAggTgCCCTgTCAgTATT Rev TTgTCACCCTCCAggATCTC
IL-6R Promoter	For ACAATCTCTGGGCTCGA Rev GGCTCTGGCTGTAAAGTAG

### 3.15 Normalisierung

Die Ergebnisse der qPCR unterliegen verschiedenen Störfaktoren wie zum Beispiel Unterschieden in der Ausgangsmenge an RNA. Eine Möglichkeit diese Störfaktoren zu korrigieren ist die Normalisierung der Expression des Ziel-Gens zur Expression eines Referenzgens. Hierbei wird die Expression des Referenzgens und des Ziel-Gens in jeder Probe parallel erfasst und anschließend die Werte des Ziel-Gens in Relation zu denen des Referenzgens angegeben. Auf diesem Weg entsteht für jede Probe eine interne Kontrolle. Das verwendete Referenzgen sollte einige Eigenschaften besitzen, die es als Kontrolle auszeichnen. Hierzu gehört eine konstante Expression in unterschiedlichen Zelltypen. Auch sollte es nicht aktiv reguliert oder von den experimentellen Bedingungen beeinflusst werden. Oft werden sogenannte „Housekeeping-Gene“ als Referenzgene herangezogen, so wie auch in diesem Fall das Gen für Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH).

### 3.16 Western-Blot

Beim Western-Blot werden Proteine elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend von einem Gel auf einen passenden Träger übertragen. Es folgt eine Anfärbung mit Antikörpern, dies ermöglicht den Nachweis spezifischer Proteine [67, 68].

Die Auftrennung der Proteine wird nach der Methode von Laemmli [69] mittels nicht-reduzierender, denaturierender Gelelektrophorese durchgeführt. Zunächst wurde ein Polyacrylamidgel mit Sammel- und Trenngel als Trägermedium erstellt. Für die Elektrophorese wurde ein so genannter Elektrophorese-Laufpuffer benutzt. Da verschiedene Proteine auch unterschiedliche elektrische Ladungen besitzen und dies die Gelelektrophorese beeinflussen kann, wurde SDS zugesetzt. SDS lagert sich je nach Größe an die Proteine und verleiht ihnen so eine einheitliche negative elektrische Ladung. Es wird auf diesem Weg eine gerichtete Bewegung im

elektrischen Feld ermöglicht. Die Bewegung ist hier vor allem vom Molekulargewicht der Proteine abhängig. Nach Zugabe von Probenpuffer erfolgte das Auftragen auf das Gel, es wurden jeweils 20 µl zusammen mit einem Molekulargewichtsstandard aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung fand bei 16 mA und 200 V für 50 Min statt.

### **3.16.1 Blotting**

Nach einer Vorbehandlung mit Methanol für 1 Min wurde die Membran gemeinsam mit dem Gel, dem Schaumstofffilter sowie dem Filterpapier für 10 Min in den Puffer gelegt. Danach wurde der Blot zusammengesetzt (Schaumstofffilter, Filterpapier, Membran, Gel, Filterpapier, Schaumstofffilter), in der Blotkammer platziert und diese mit Transferpuffer gefüllt. Danach wurde ein elektrisches Feld mit einer Stromstärke von 250 mA angelegt. Die negativ geladenen Proteine wandern zur Anode und gelangen vom Gel auf die Membran. Die freien Proteinbindungsstellen wurden dadurch blockiert, dass die Membran für 1 h in PBS mit Magermilchpulver (5%) geschüttelt wird.

### **3.16.2 Bindung der spezifischen Antikörper**

Nach dem Blockieren freier Bindungsstellen wurde die Membran fünfmal für je 10 Min mit PBS/Tween gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper, welcher zuvor mit PBS mit 1% Magermilchpulver verdünnt wurde. Nach 12 h wurde erneut mehrmals mit PBS/Tween gewaschen und dann mit dem zweiten Antikörper welcher mit HRP konjugiert ist erneut für 1 h inkubiert. Es folgte das erneute mehrfache Waschen der Membran.

### **3.16.3 Visualisierung der Proteinbanden**

Um die Proteine sichtbar zu machen wurde die Membran mit einer Mischung aus Chemolumineszenz-Substrat A und B (1:2) für 1 Min inkubiert und anschließend mit Hilfe von Verstärkerfolie in der Dunkelkammer ein Röntgenfilm entwickelt.

### 3.17 Chromatin-Immunpräzipitation mittels MACS-Technologie

Zur Vorbereitung für die Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) müssen Protein-Chromatin-Bindungen durch Behandlung der Zellen mit Formaldehyd fixiert werden. Anschließend wird mit Hilfe einer Ultraschallsonde das Chromatin fragmentiert (ca. 500 Bp). Mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers gegen das DNA-bindende Ziel-Protein (hier: azetyliertes Histon 3) können dann die Abschnitte isoliert werden, die das Protein gebunden haben.

Naive CD4<sup>+</sup>-Zellen wurden wie zuvor (3.10.4) beschrieben isoliert und für 3 h mit ITF2357 inkubiert. Danach wurden die Zellen mit TZM gewaschen und für 1 Min mit Formaldehyd (0,5%) für 4 Min. inkubiert. Durch Zugabe von Glyzin (125 mM) wurde die Fixierung gestoppt und die Zellen danach erneut mit PBS gewaschen. Durch Zugabe von SDS-haltigem Lysepuffer wurden die Zellen anschließend lysiert und die genomische DNA mittels eines Ultraschall-Homogenisators in Fragmente zerteilt. Es folgte die Zugabe von je 300 µl Verdünnungspuffer zu jeder Probe. Danach konnte der monoklonale, anti-Azetyl-Histon 3-Antikörper hinzugegeben werden, gefolgt von einer zweistündigen Inkubationszeit. Im nächsten Schritt wurden je 20 µl Protein A-beschichtete MicroBeads zu jeder Probe gegeben. Das Besondere an Protein A ist seine Fähigkeit Immunglobuline zu binden. Nach einer einstündigen Inkubationszeit wurde die Probe auf die Säule aufgetragen. Nach mehrmaligem Waschen der Säule erfolgte durch Zugabe von heißem Elutions-Puffer das Lösen der DNA-Fragmente. Die weitere Analyse erfolgte mittels qPCR, wie bereits unter 3.14.3 beschrieben.

### 3.18 Statistik

Die Ergebnisse sind als arithmetisches Mittel angegeben. Die Streuung wird als Standardfehler des Mittelwertes (*standard error of mean*, SEM) angegeben. Um die statistische Signifikanz der Unterschiede einzelner Ergebnisse zu bestimmen, wurden entweder der One way Anova oder der Two way Anova durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde bei p-Werten < 0,05 angenommen. Alle statistischen Berechnungen wurden mit Hilfe der Software Graph Pad Prism 5 (San Diego, CA, USA) durchgeführt. Die grafische Darstellung der Daten erfolgte ebenfalls mittels Graph Pad Prism sowie PowerPoint (Microsoft, USA).

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Wirkung des Histon-Deazetylase-Inhibitors ITF2357 auf die Zytokinproduktion von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen**

Neben der anti-proliferativen ist die anti-inflammatorische Wirkung der HDAC-Inhibitoren in der Literatur beschrieben [21, 22]. Die verantwortlichen Mechanismen sind weitestgehend unverstanden. Mit der vorliegenden Arbeit sollte die HDAC-abhängige Regulation der Zytokinproduktion von T-Helferzellen charakterisiert werden.

Um zunächst grundsätzlich den Effekt von HDAC-Inhibition bei CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zu untersuchen wurden diese aufgereinigten Zellen mit aufsteigenden Konzentrationen des HDAC-Inhibitors ITF2357 präinkubiert und nach 1 h im Brutschrank wie angegeben stimuliert. Die Dauer der Präinkubation von 1 h basiert auf Vorarbeiten [21, 22].

Zur Stimulation sind zwei verschiedene Methoden mit unterschiedlichen Angriffspunkten und Wirkmechanismen etabliert. Entweder fand die Stimulation mit dem Mitogen ConA oder mit anti-CD3- und anti-CD28-Antikörpern statt. Nach 48 h wurden Überstände abgenommen und mit Hilfe eines ELISA die IFN $\gamma$ -Konzentration bestimmt.

#### **4.1.1 Wirkung des Histon-Deazetylase-Inhibitors ITF2357 auf CD4<sup>+</sup>-T-Zellen nach anti-CD3/-CD28 Stimulation**

Bei der Stimulation der Zellen mit anti-CD3-/CD28-Antikörpern ohne Zugabe des HDAC-Inhibitors ITF2357 konnte nach 48 h eine maximale IFN $\gamma$ -Konzentration von über 20 ng/ml festgestellt werden. Bei gleicher Stimulation in Anwesenheit des HDAC-Inhibitors in einer Konzentration von 100 nM kam es zu einer geringen Hemmung der IFN $\gamma$ -Produktion. Die höhere Konzentration von 200 nM ITF2357 führte zu keiner weiteren Hemmung im Vergleich zu 100 nM, dagegen war nach Zugabe des HDAC-Inhibitors in einer Konzentration von 400 nM im Überstand kein IFN $\gamma$  mehr nachweisbar.

Am Ende der Inkubationszeit wurde parallel ein Teil der Zellsuspension abgenommen, mit Trypanblau gefärbt und im Mikroskop auf die Vitalität hin

untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die Zellsuspensionen der Proben, die mit dem Inhibitor in einer Konzentration von 100 oder 200 nM ITF2357 behandelt wurden, nicht mehr tote Zellen aufwiesen als die unbehandelten. Unter denen mit 400 nM ITF2357 behandelten Zellen war der Großteil der Zellen nicht mehr vital.

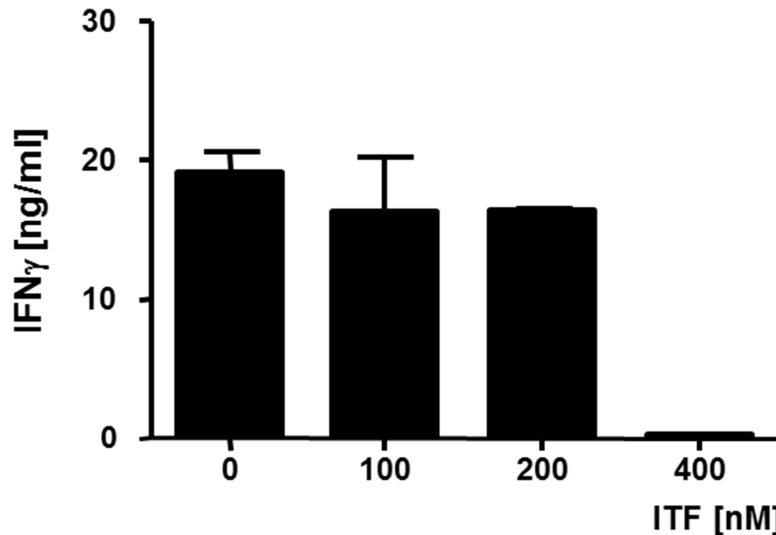


Abbildung 6: Wirkung von ITF2357 auf CD4<sup>+</sup>-T-Zellen nach anti-CD3/-CD28-Stimulation

Mittels ELISA wurde im Überstand 48 h nach Behandlung mit ITF2357 und Stimulation mit anti-CD3/-CD28 die IFN $\gamma$ -Konzentration im Überstand gemessen. Die Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM, n =10 dargestellt.

#### 4.1.2 Wirkung auf CD4<sup>+</sup>-T-Zellen unter Concanavalin A-Stimulation

Frisch isolierte CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden mit ITF2357 in aufsteigenden Konzentrationen von 0 bis 400 nM für eine Stunde präinkubiert und anschließend mit ConA stimuliert. Bei dieser Stimulationsmethode war die IFN $\gamma$ -Konzentration insgesamt um ein zehnfaches geringer als bei der Stimulation mit anti-CD3/-CD28 und lag bei Werten zwischen 1 und 3 ng/ml.

Die Behandlung der Zellen mit ITF2357 in einer Konzentration von 100 nM führte im Vergleich zu den nicht behandelten Zellen zu einer signifikanten Abnahme der IFN $\gamma$ -Produktion von  $2,7 \pm 0,07$  auf  $1,9 \pm 0,3$  ng/ml (\*p<0,05).

Die Präinkubation der Zellen mit ITF2357 in einer höheren Konzentration von 200 nM resultierte im Vergleich zu den unbehandelten Zellen zu einer weiteren Abnahme der IFN $\gamma$ -Produktion von  $2,7 \pm 0,07$  auf  $1,5 \pm 0,03$  ng/ml. Bei den Zellen, die mit einer Konzentration von 400 nM ITF2357 behandelt wurden, war die Zytokinproduktion um über 50% geringer als bei den unbehandelten Zellen bei weiterhin bestehender Vitalität der Zellen. Es konnte somit eine klare dosisabhängige Suppression des pro-

inflammatorischen Zytokins  $\text{IFN}\gamma$  durch Inhibition der HDAC festgestellt werden (siehe auch Abbildung 7).

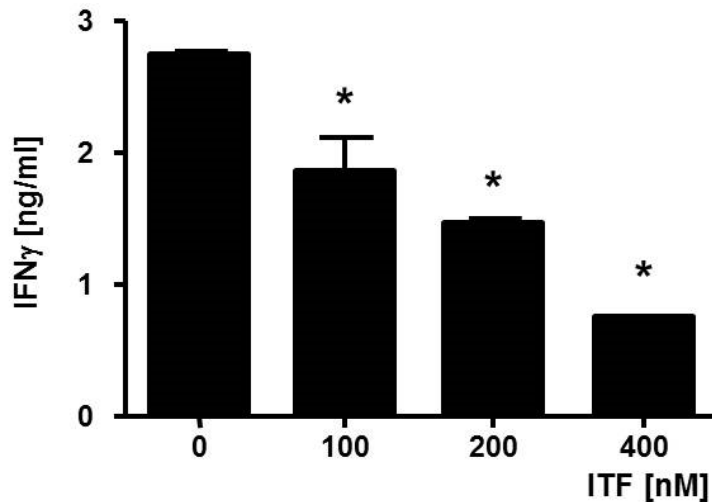


Abbildung 7: Wirkung auf  $\text{CD4}^+$ -T-Zellen unter ConA-Stimulation

Gemessen wurde die  $\text{IFN}\gamma$ -Konzentration im Überstand, 48 h nach Behandlung mit ITF2357 und Stimulation mit ConA, mittels ELISA. Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n = 10$ ; \* $p < 0,05$

#### 4.2 Wirkung des Histon-Deazetylase-Inhibitors ITF2357 auf Th1-Polarisierung im Antigen-spezifischen System

Aus Milzen und Lymphknoten von DO11.10-Mäusen wurden mit Hilfe magnetischer Zellsortierung naive T-Zellen ( $\text{CD4}^+/\text{CD62L}^+$ ) isoliert. Diese wurden anschließend in aufsteigenden Konzentrationen mit dem HDAC-Inhibitor ITF2357 behandelt. Nach 1 h Präinkubation mit dem HDAC-Inhibitor ITF2357 wurden die naiven T-Helferzellen antigenspezifisch (Ova-Peptid) mittels APZ stimuliert. Diese wurden aus Splenozyten von BALB/c Mäusen isoliert. Die Stimulation der Zellen fand unter Th1-polarisierenden Bedingungen, das heißt in Anwesenheit von IL-12 und anti-IL-4-Antikörpern statt.

Nach 48 h wurden Überstände abgenommen und die  $\text{IFN}\gamma$ -Konzentration mittels ELISA bestimmt.

Wie Abbildung 8 zeigt, führt die Anwesenheit des HDAC-Inhibitors ITF2357 zu einer dosisabhängigen Steigerung der  $\text{IFN}\gamma$ -Produktion. Die Zugabe des Inhibitors in einer Konzentration von 50 nM führte zu einer um über 50% erhöhten  $\text{IFN}\gamma$ -Produktion im



Vergleich zu den nicht behandelten Zellen. Auch nach Zugabe des Inhibitors bis zu einer Konzentration von 200 nM war die gemessene IFN $\gamma$ -Konzentration signifikant höher als bei den unbehandelten Zellen (siehe auch Abbildung 9).

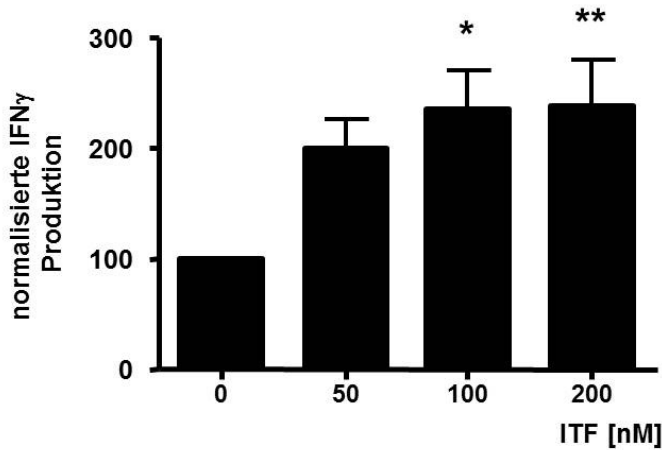


Abbildung 8: Wirkung des Histon-Deazetylase-Inhibitors ITF2357 auf Th1-Polarisierung im Antigen-spezifischen System

Gemessen wurde die IFN $\gamma$ -Produktion im Überstand mittels ELISA nach Behandlung von CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>-Zellen mit ITF2357 in aufsteigenden Konzentrationen für eine 1 h gefolgt von Th1-Polarisierung und Stimulation mit APZ. Mittelwerte  $\pm$  SEM, n = 10; \*p<0,05

Nach sieben Tagen wurden die Zellen unspezifisch mit PMA und Ionomycin restimuliert und so zur Zytokinproduktion angeregt. Die IFN $\gamma$  produzierenden Zellen wurden mittels intrazellulärer Färbung durchflusszytometrisch analysiert. Wie Abb. 9 zeigt, kam es auch hier zu einer dosisabhängigen Zunahme der IFN $\gamma$ -produzierenden Zellen.

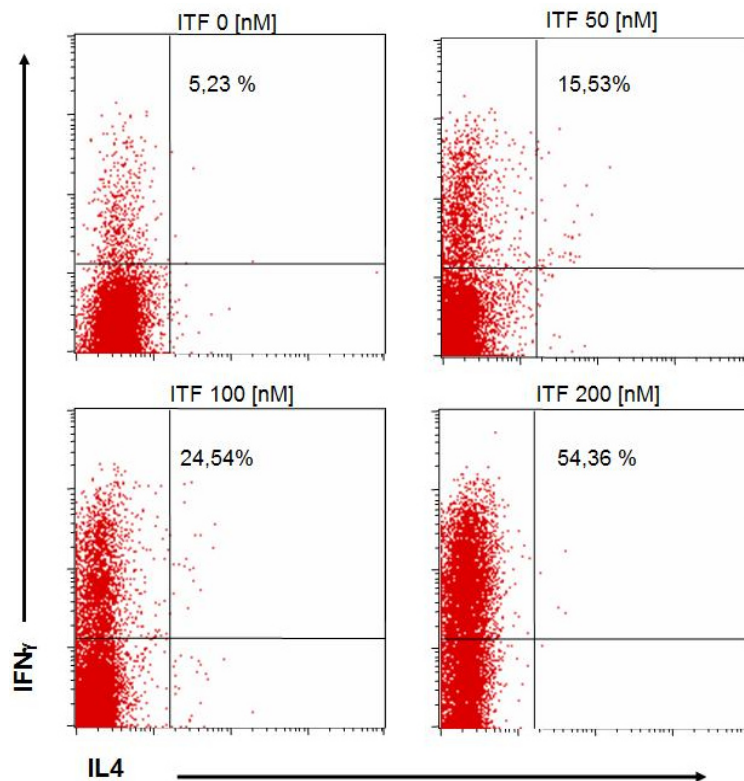


Abbildung 9: Wirkung von ITF2357 auf die Polarisierung von Th1-Zellen

Naive CD4<sup>+</sup>/CD62L<sup>+</sup>-T-Zellen wurden unter Th1 polarisierenden Bedingungen mit ITF2357 in aufsteigenden Dosen behandelt und mit APZ stimuliert. Nach 7 Tagen wurden die Zellen mit PMA und Ionomycin behandelt und der Anteil IFN $\gamma$ -produzierenden Zellen durchflusszytometrisch bestimmt.

### 4.3 Wirkung des HDAC-Inhibitors ITF2357 auf den IL-6-Rezeptor bei naiven T-Zellen

Naive CD4<sup>+</sup>/CD62L<sup>+</sup>-T-Lymphozyten wurden mittels MACS-Technologie isoliert und für 1, 2, 3 h mit ITF2357 inkubiert und nachfolgend zur Expressionsanalyse lysiert. Es konnte gezeigt werden, dass bei naiven CD4<sup>+</sup>-T-Zellen die Expression des IL-6-Rezeptors (IL-6R) in Anwesenheit des Inhibitors herabreguliert wird (Abb. 10). Untersucht wurde die mRNA-Expression des IL-6R mittels qPCR im Vergleich zu naiven Zellen welche nicht mit dem Inhibitor behandelt wurden. Wobei der größte Effekt nach 3 h Inkubation mit ITF2357 eintrat.

Diese Beobachtung konnte durch eine Chromatinimmunpräzipitation (ChIP) weiter untermauert werden. Nach dreistündiger Inkubation mit ITF2357 wurde die Histon 3-Azetylation am IL-6R Genlocus mittels ChIP und anschließender qPCR untersucht. Wie Abbildung 11 zeigt, konnte eine Hyperazetylation am IL-6R Genlocus festgestellt werden.

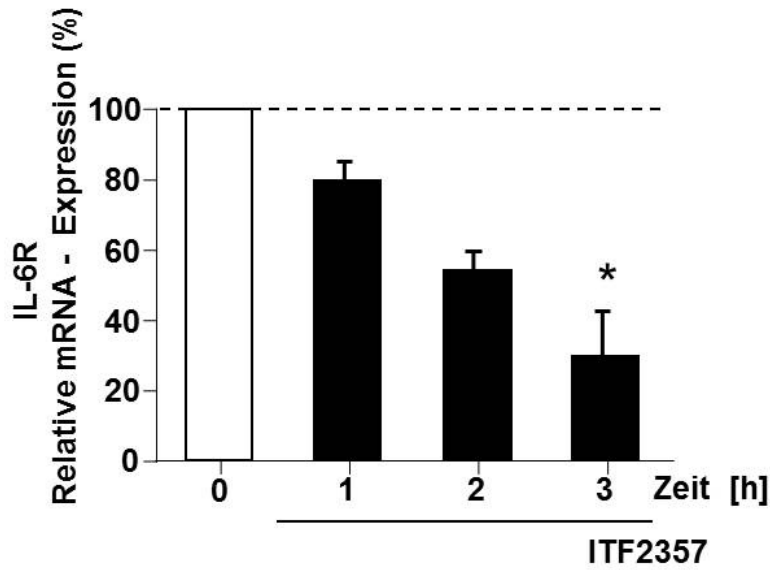


Abbildung 10: Expression der IL6-R mRNA in naiven T-Zellen nach Inkubation mit ITF2357

Naive  $CD4^+/CD62L^+$ -T-Zellen wurden mit ITF2357 (200 nM) inkubiert und danach bezüglich der Expression von IL-6R mRNA mittels qPCR analysiert.

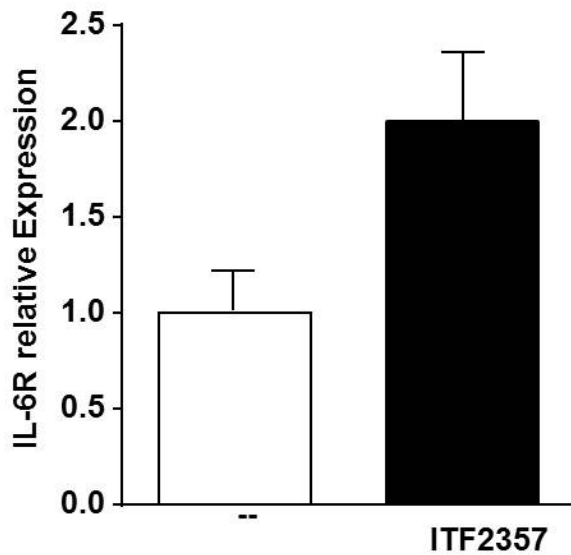


Abbildung 11: ChIP-Analyse des Histon H3 Azetylierungsstatus am IL-6R

Naive  $CD4^+/CD62L^+$ -T-Zellen wurden mit ITF2357 (200 nM) inkubiert. Es folgte die Analyse des Histon H3-Azetylierungsstatus am *IL-6R* mittels ChIP

## **4.4 Einsatz der siRNA-Technologie zur Charakterisierung funktioneller Eigenschaften einzelner HDAC**

### **4.4.1 Entwicklung optimaler Transfektionsbedingungen**

Zur Untersuchung spezifischer Gene können Zellen mit siRNA transfiziert werden, was zum vorübergehenden posttranskriptionellem Ausschalten dieser Gene führt und so Schlüsse über deren Funktion zulässt.

Für die Transfektion gibt es sowohl chemische als auch physikalische Verfahren. In der hier vorliegenden Arbeit wurde das physikalische Verfahren, die Elektroporation verwendet. Bei der Elektroporation wird die Zellmembran durch einen elektrischen Impuls permeabilisiert. So können neben Plasmiden auch siRNAs in die Zelle eingeschleust werden, die die Expression von bestimmten Proteinen stoppen. Um herauszufinden welche HDAC für die beobachteten Effekte verantwortlich sind, wurden verschiedene HDAC spezifisch, unter Einsatz der „small interfering“ (si)RNA-Technologie, gehemmt.

Ob die siRNA tatsächlich in die Zelle gelangt und dort das jeweilige Zielprotein hemmt, wurde sowohl auf RNA-Ebene als auch auf Protein-Ebene getestet. Zum einen wurde mit der quantitativen-PCR auf mRNA-Ebene die Quantität der Hemmung untersucht, zum anderen durch eine Western-Blot-Analyse die Hemmung auf Proteinebene überprüft. Dies ist entscheidend, da eine ausreichende Hemmung auf der mRNA-Ebene nicht zwingend bedeutet, dass letztlich zum Analysezeitpunkt auch tatsächlich weniger Protein in der Zelle vorliegt.

### **4.4.2 Dauer des Effektes der siRNA**

Nach erfolgreicher Elektroporation sollte sich die siRNA in der Zelle befinden und die mRNA des Zielgens abgebaut werden. Der mRNA-Gehalt der jeweiligen Proteine sind laut der Literatur bis zu 24-48 h nach der Transfektion deutlich reduziert [70]. Um herauszufinden wann in dem hier untersuchten Fall die Hemmung durch die siRNA am stärksten ist und somit festzulegen zu welchem Zeitpunkt die Lyse der Zellen bzw. die Abnahme von Überständen erfolgen sollte, wurde die Transfektionseffizienz zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht. Nach Transfektion mit siRNA gegen HDAC1 wurde die mRNA-Expression mit Hilfe der

qPCR einmal nach 24 h und einmal nach 48 h bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass die Hemmung des mRNA-Gehalts nach 24 h bei 71% lag, während nach 48 h nur noch eine Hemmung von 35% nachzuweisen war. Zum Nachweis der Hemmung zu den unterschiedlichen Zeitpunkten auf Proteinebene wurde eine Western-Blot-Analyse durchgeführt. Wie in Abbildung 13 sichtbar, zeigt sich hier, dass die Proteinmenge nach 48 h höher ist als nach 24 h.

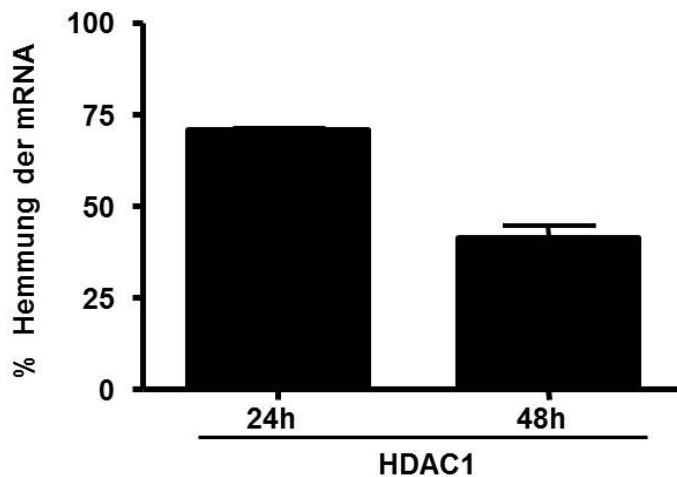


Abbildung 12: Prozent Hemmung der mRNA von HDAC1 in CD4<sup>+</sup>-T-Zellen nach 24 und 48h

Aus Milz und Lymphknoten von BALB/c-Mäusen wurden CD4<sup>+</sup>-T-Zellen mittels MACS isoliert und mit HDAC1-spezifischer siRNA transfiziert. Nach 24 h und nach 48 h wurden die Zellen lysiert, eine RNA-Isolation durchgeführt und die erhaltene RNA in cDNA umgeschrieben. Die relative Expression von HDAC1 wurde mittels qPCR bestimmt. Als interne Kontrolle fungierte GAPDH. Die Hemmung wurde relativ zu einer Kontrolle (unspezifische Kontroll-siRNA) berechnet. Mittelwerte ± SEM, n = 2

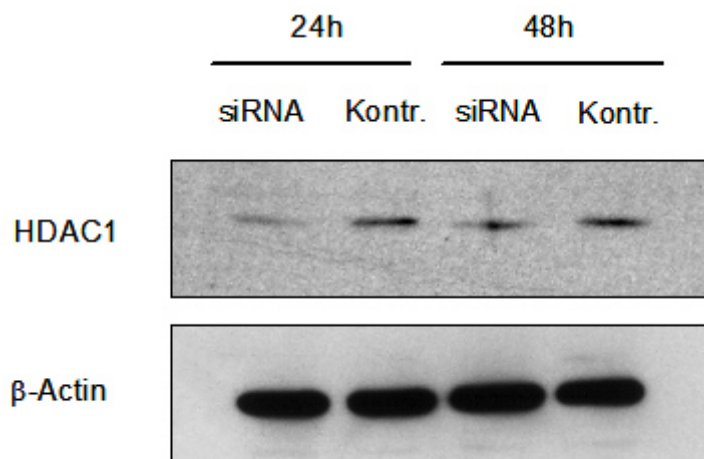


Abbildung 13: Western-Blot-Analyse zum Nachweis einer adäquaten Hemmung auf Proteinebene

Aus Milz und Lymphknoten von BALB/c-Mäusen wurden CD4<sup>+</sup>-T-Zellen mittels MACS isoliert und mit HDAC1-spezifischer siRNA transfiziert. Nach 24 und nach 48 h wurden die Zellen lysiert. Mittels Western-Blot konnte nachgewiesen werden, dass nach 48 h eine größere Proteinmenge vorhanden ist.

#### 4.4.3 Einfluss der Voltzahl und der Impulslänge auf die Transfektionseffizienz

Die Höhe der Voltzahl spielt eine entscheidende Rolle dabei, ob eine Zelle den Elektroporationsprozess überlebt und wie hoch die Transfektionseffizienz ist. Die Transfektionseffizienz wird dadurch bestimmt wie viel siRNA in die Zelle gebracht wird und wie viele Zellen, nach der Transfektion noch vital sind. Um einen möglichst geringen Verlust an Zellen zu erreichen, sollten Voltzahlen definiert werden, die so niedrig wie möglich sind und trotzdem zu einer möglichst starken Hemmung des Zielgens führen. Für die Auswahl der zu testenden Spannungen wurden bereits etablierte Bedingungen für primäre Zellen aus der Arbeitsgruppe herangezogen [71, 72].

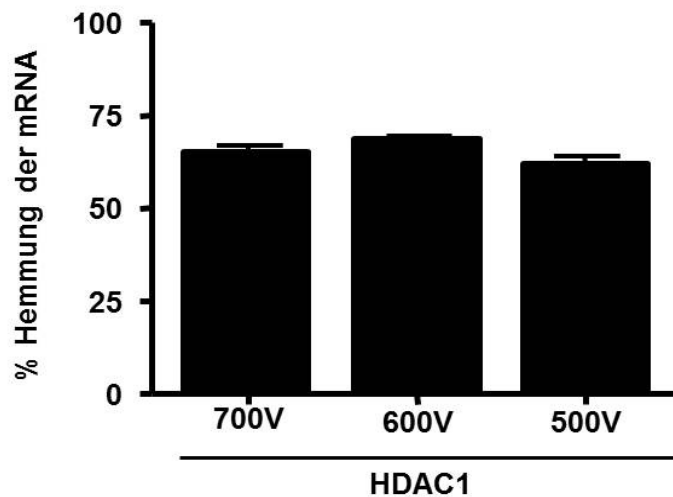


Abbildung 14: Einfluss der Voltzahl auf die Transfektionseffizienz

CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden mit einer siRNA gegen HDAC1 mit 700, 600 oder 500 V für 400µs transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen lysiert, RNA isoliert und die erhaltene RNA in cDNA umgeschrieben. Die relative Expression von HDAC1 wurde mittels qPCR bestimmt. Als interne Kontrolle fungierte GAPDH. Die Hemmung wurde relativ zu einer Kontrolle (unspezifische Kontroll-siRNA) berechnet. Mittelwerte ± SEM, n = 5

CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden mit einer siRNA gegen HDAC1 bei 700, 600 oder 500 V jeweils für 400 µs transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen lysiert. Anschließend wurde die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben, so dass die Transfektionseffizienz indirekt mit der qPCR überprüft werden konnte. Hierbei wurde festgestellt, dass die Höhe der Voltzahl innerhalb des untersuchten Spannungsbereiches keinen Einfluss auf die durch den Einsatz der siRNA erzielte Hemmung der mRNA ausübt. Wie in Abbildung 12 dargestellt, konnte bei allen drei eingesetzten Spannungen eine gleichbleibende Hemmung von durchschnittlich über

60% für HDAC1 erreicht werden. Die weiteren Experimente wurden mit einer Voltzahl von 500 V durchgeführt.

In weiteren Versuchen wurde die Länge (Mikrosekunden,  $\mu\text{s}$ ) des Impulses variiert. Um die optimale Impulslänge zu bestimmen, wurden hier  $\text{CD4}^+$ -T-Zellen unter anderem mit einer siRNA gegen HDAC9 bei konstanter Voltzahl aber variierender Länge des Impulses transfiziert. Außerdem wurden in diesen Versuchen zwei verschiedene Kontrollen eingesetzt. Als Negativ-Kontrolle wurde eine kommerziell erhältliche unspezifische Kontroll-siRNA benutzt. Als Positiv-Kontrolle wurde eine spezifische, gegen  $\text{IFN}\gamma$  gerichtete siRNA verwendet. Die Transfektion mit den drei siRNAs fand bei einer gleich bleibenden Voltzahl von 500 V statt, während die Länge des Impulses zwischen 400, 600 und 750  $\mu\text{s}$  variiert wurde. Nach 24 h wurden Überstände abgenommen und mittels ELISA die Zytokinproduktion gemessen. Unter diesen Bedingungen war eine zunehmende Impulslänge mit einer signifikanten Abnahme der  $\text{IFN}\gamma$ -Produktion assoziiert.

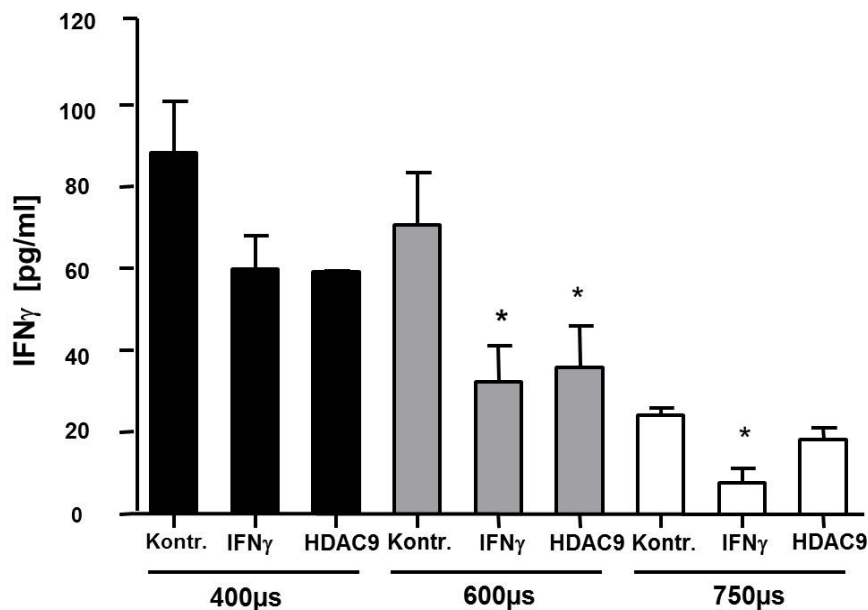


Abbildung 15: Einfluss der Impulslänge auf die Transfektionseffizienz

$\text{CD4}^+$ -T-Zellen wurden mit einer siRNA gegen HDAC9 bei konstanter Voltzahl von 500 V aber variierender Länge des Impulses transfiziert. Als Negativ-Kontrolle wurde eine kommerziell erhältliche unspezifische Kontroll-siRNA benutzt. Als Positiv-Kontrolle wurde eine spezifische, gegen  $\text{IFN}\gamma$  gerichtete siRNA verwendet. Nach 24 h wurden Überstände abgenommen und mittels ELISA die Zytokinproduktion gemessen. Die Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n=10$  dargestellt.

#### 4.5 Auswahl der siRNA

Die einzelnen siRNA wurden zunächst auf ihre Effizienz getestet, wobei die siRNA als effizient eingestuft wurde, wenn sie in dem zuvor etablierten System, unter der Verwendung eines Elektroporationsimpulses mit einer Stärke von 500 V und einer Länge von 400  $\mu$ s eine Hemmung von mindestens 50% erzielte.

Frisch isolierte CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden mit den einzelnen siRNA transfiziert und nach 24 h lysiert. Einige der siRNA erzielten sofort die angestrebte Effizienz von über 50% Hemmung der mRNA. Dies war für die HDAC1, 2, 4, 8 und 10 der Fall (siehe auch Abbildung 16).

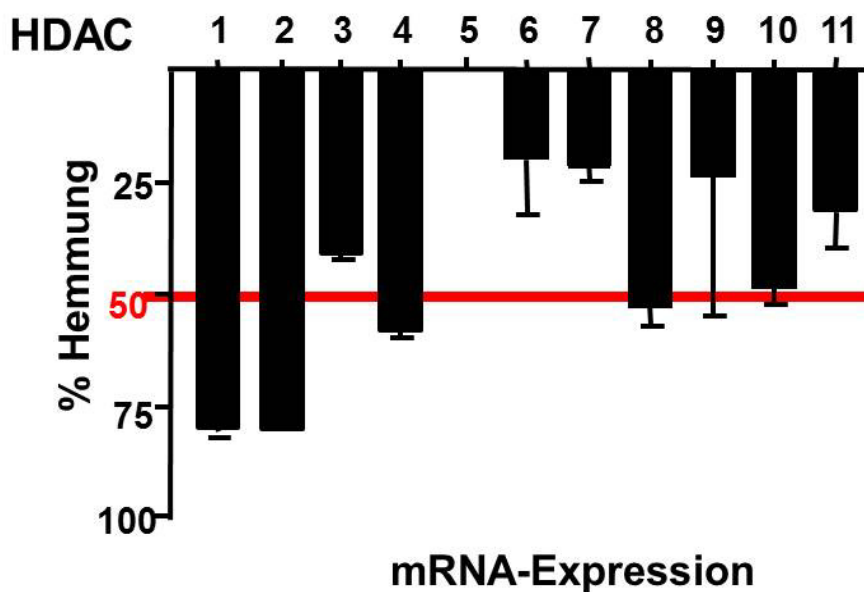


Abbildung 16: Effizienzprüfung der eingesetzten siRNA.

CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden mit spezifischen siRNA gegen die HDAC 1-11 transfiziert. Nach 24h wurden die Zellen lysiert und mittels qPCR die Effizienz der siRNA überprüft, wobei eine effiziente Hemmung ab 50% angenommen wurde.

Für die HDAC3, 5, 6, 7, 9 und 11, die mit der ersten siRNA nur ungenügend, bzw. gar nicht gehemmt werden konnten, wurden alternative siRNA, mit anderer Sequenz eingesetzt. Der Einsatz dieser neuen siRNA führte dazu, dass nun auch für die HDAC3, 9 und 11 eine Hemmung der mRNA Level von über 50% erreicht wurde.

Für die HDAC5, 6 und 7 wurden nun beide siRNA gleichzeitig eingesetzt. Dies führte im Falle von HDAC5 zu einer Hemmung von 78%, bei HDAC6 zu Hemmung von 60% und bei HDAC7 zu einer Hemmung 70% der mRNA-Expression (siehe auch Tabelle 5 und Abb. 17).



Tabelle 5: siRNA-Strategien für die HDAC5, 6 und 7.

Dargestellt ist die % Hemmung der mRNA-Expression die durch Einsatz von zwei verschiedenen siRNA gleichzeitig

	HDAC5	HDAC6	HDAC7
siRNA I	1	20	32
siRNA II	48	30	48
siRNA I + siRNA II	78	60	70

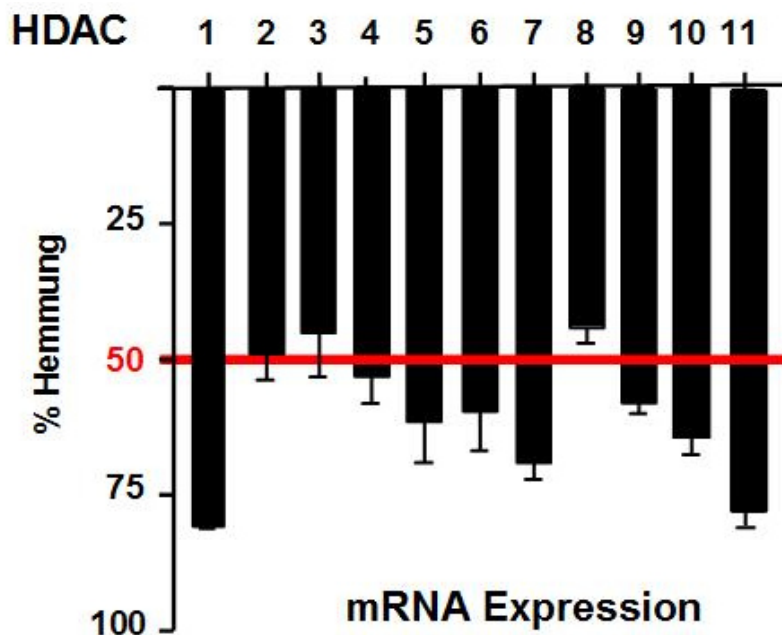


Abbildung 17: Verbesserung der Effizienz durch Einsatz mehrerer siRNA.

Durch den Einsatz mehrerer spezifischer siRNA gegen einzelne HDAC in CD4<sup>+</sup>-T-Zellen konnte für HDAC1, 4, 5, 6, 7, 9, 10 und 11 eine Hemmung der mRNA von über 50% erzielt werden.

#### 4.6 Wirkung spezifischer HDAC auf die IFN $\gamma$ -Produktion

In den weiterführenden Experimenten wurden einzelne HDAC gezielt zur weiteren Untersuchung ausgewählt. Zum einen da, wie in der Einleitung (1.1.2) ausführlich beschrieben verschiedene HDAC für unterschiedliche Prozesse verantwortlich sind und zum anderen da so die Spezifität des therapeutischen Ansatzes verbessert werden kann.

Aus der Gruppe der HDAC Klasse II wurden mit HDAC5, 7, 9, 10 und 11 mehrere untersucht. Als Vertreter der HDAC Klasse I wurde HDAC1 für die Versuche ausgewählt.

Es wurden CD4<sup>+</sup>-T-Zellen mit den spezifischen siRNA unter den in 2.14 beschriebene Bedingungen transfiziert und im Anschluss mit ConA für 48 Stunden stimuliert. Als Negativ-Kontrolle wurde jeweils eine unspezifische Kontroll-siRNA eingesetzt, während eine siRNA gegen IFN $\gamma$  als Positiv-Kontrolle diente.

Wie in Abbildung 18 dargestellt, hat die spezifische Hemmung von HDAC1, 10 und 11 kaum Einfluss auf die IFN $\gamma$ -Produktion. Hingegen führte die Hemmung von HDAC5 zu einer um 50% geringeren IFN $\gamma$ -Produktion als bei den Zellen, die mit der Kontroll-siRNA transfiziert wurden. Auch bei der Hemmung von HDAC7 und HDAC9 wurde im Vergleich zur Negativ-Kontrolle eine signifikant geringere IFN $\gamma$ -Produktion festgestellt.

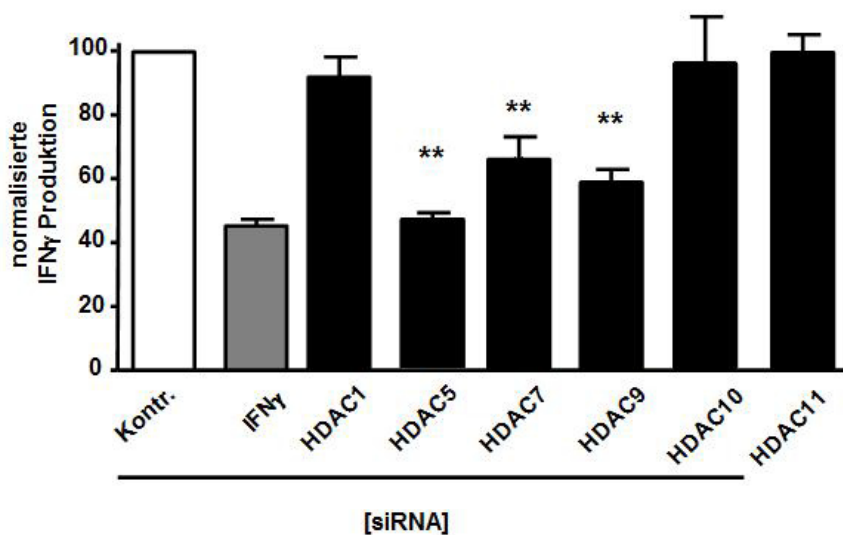


Abbildung 18: Einfluss der Hemmung spezifischer HDAC auf die IFN $\gamma$  Produktion

CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden mit siRNA transfiziert und anschließend mit ConA stimuliert. Die signifikante Hemmung der IFN $\gamma$ -Produktion in den Zellen die mit spezifischer siRNA gegen HDAC7 und 9 transfiziert wurden entsprach dem beobachteten anti-inflammatorischen Effekt der HDAC-Inhibitoren.

## 5 Diskussion

Bereits in früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe konnte ein anti-inflammatorischer Effekt für die pan-HDAC-Inhibition nachgewiesen werden. Mit der vorliegenden Arbeit konnte dieser anti-inflammatorische Effekt selektiv zum einen für naive CD4<sup>+</sup>-T-Zellen sowie für T-Effektorzellen gezeigt werden. Ferner zeigte sich, dass auch die Art der Stimulation der Zellen, entweder mit ConA oder anti-CD3 und anti-CD28 einen maßgeblichen Effekt auf die Wirkung des Inhibitors ausübt.

Als mögliche mechanistische Erklärung für diesen Effekt gelang es eine Abnahme des IL6-R auf naiven T-Zellen nach Behandlung mit ITF2357 zu zeigen.

An diese Befunde anknüpfend zielte der zweite Teil der Arbeit auf die Charakterisierung einzelner HDAC und ihrer spezifischen Funktion. Um herauszufinden, welche HDAC für die beobachteten Effekte verantwortlich sind, wurden verschiedene HDAC spezifisch unter Einsatz der „small interfering“ (si)RNA-Technologie gehemmt. Als Parameter zur Auswertung wurde auch hier die IFN $\gamma$ -Konzentration im Überstand herangezogen.

Bei der Untersuchung der spezifischen Wirkung einzelner HDAC konnten HDAC5, HDAC7 sowie HDAC9 als kritische Regulatoren der IFN $\gamma$ -Produktion in T-Zellen identifiziert werden.

### 5.1 HDAC-Inhibition durch ITF2357

Bei den HDAC-Inhibitoren handelt es sich um eine heterogene Gruppe verschiedener Substanzen, die verschiedenen Stoffklassen angehören, jedoch alle gemeinsame Zielenzyme, die Histon-Deazetylasen (HDAC) haben. Wie in der Einleitung beschrieben existieren verschiedene Klassen der HDACs. Der Großteil der existierenden HDAC-Inhibitoren, wie das für seine antiproliferative Wirkung als Goldstandard geltende SAHA, sind Inhibitoren die unselektiv alle HDAC hemmen, sogenannte pan-HDAC-Inhibitoren. Bei dem in dieser Arbeit eingesetzten HDAC-Inhibitor ITF2357 handelt es sich ebenfalls um einen potenten Inhibitor aller HDAC-Isoformen [9].

ITF2357 besitzt analog zu anderen HDAC-Inhibitoren eine anti-proliferative Wirkung, dies konnte unter anderem in Versuchen mit der Multiplen Myelom-Zelllinie KMS-18 gezeigt werden [73]. Hier wurden bereits Phase II-Studien bei Patienten mit einem Myelom-Rezidiv durchgeführt. [74]. ITF2357 könnte somit eine neue therapeutische Strategie z. B. für die Behandlung von malignen hämatologische Krankheiten eröffnen. Es ist besonders hervorzuheben, dass beim Einsatz von ITF2357 eine um den Faktor zehn niedrigere Konzentration eingesetzt werden kann, um eine anti-inflammatorische Wirkung zu erzielen, als dies bei SAHA, dem für seine anti-proliferative Wirkung als Goldstandard geltenden HDAC-Inhibitors, der Fall ist [75].

Neben der anti-proliferativen Wirkung von ITF2357 ist zusätzlich eine anti-inflammatorische Wirkung bekannt, die in den letzten Jahren von mehreren Gruppen sowohl *in vitro* als auch in verschiedenen Modellen *in vivo* beschrieben wurde [22, 26, 27, 76, 77]. In diesem Zusammenhang wurde auch gezeigt, dass der anti-entzündliche Effekt des Inhibitors bei sehr viel geringeren und somit deutlich weniger toxischen Konzentrationen einsetzt als die antiproliferative Wirkung. Auch in klinischen Studien wird der Wirkstoffe im Augenblick auf seine Wirkung bei der Behandlung von Morbus Crohn, juveniler Arthritis und auto-inflammatorischer Syndrome genauer untersucht [24].

Unklar bleibt bisher welcher Mechanismus der entscheidende hinter der anti-inflammatorischen Wirkung der HDACi ist. Gezeigt werden konnte, dass es bei Monozyten nach Stimulation mit LPS und Behandlung mit dem HDACi SAHA zu einer verminderten Produktion von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  kommt [21, 26]. Ebenfalls konnte in den letzten Jahren durch die Arbeitsgruppe um Wayne W. Hancock gezeigt werden, dass die Behandlung mit einem panHDACi die Proliferation von regulatorischen Foxp3-Zellen positiv beeinflusst [63].

Nachgewiesen werden konnte in der hier vorliegenden Arbeit eine Hemmung der IFN $\gamma$ -Produktion von CD4<sup>+</sup>-T-Effektorzellen durch den HDAC-Inhibitor ITF2357. Dies stimmt mit den schon zuvor erzielten Ergebnissen [27] überein, dass ITF2357 eine anti-inflammatorische Wirkung auf Zellen wie mononukleäre Zellen des peripheren Bluts (PBMC) und lymphoid bone marrow culture (LBMC) besitzt. Hervorzuheben ist, dass in dieser Arbeit erstmals isoliert die anti-inflammatorische Wirkung auf CD4<sup>+</sup>-T-

Zellen beschrieben werden konnte. Auch für andere HDAC-Inhibitoren wurde schon eine anti-entzündliche Wirkung beschrieben [26], siehe hierzu auch Tabelle 6.

Tabelle 6: Übersicht über die anti-inflammatorische Wirkung von HDAC-Inhibitoren in Tiermodellen

<b>Modell</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Literatur</b>
Septischer Schock	LPS-induzierter Schock im Mausmodell	„The antitumor histone deacetylase inhibitors suberoylanilide hydroxamic acid exhibits anti-inflammatory properties via suppression of cytokines” ([21])
Experimentelle Kolitis	DSS-Kolitis im Mausmodell	“Histone deacetylases: novel targets for prevention of colitis-associated cancer in mice” [27]
Entzündungsreaktion von Gliazellen		“Histone deacetylase (HDAC) inhibitors reduce the glial inflammatory response <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> ” [75]
Rheumatoide Arthritis		“Histone deacetylase inhibitors suppress inflammatory activation of rheumatoid arthritis patient synovial macrophages and tissue” [78]

## 5.2 Einfluss der unterschiedlichen Stimulationsformen auf die Wirkung des HDAC-Inhibitors in CD4<sup>+</sup>-T-Zellen

Der verantwortliche Mechanismus für die Vermittlung des anti-inflammatorischen Effekts ist bislang weitestgehend unklar. Um zunächst selektiv den Effekt für spezifische Zellpopulationen zu klären, liegt der Fokus dieser Arbeit auf CD4<sup>+</sup>-T-Zellen.

Bei der Untersuchung der anti-inflammatorischen Wirkung des HDAC-Inhibitors ITF2357 auf CD4<sup>+</sup>-T-Zellen konnte in der vorliegenden Arbeit eine unterschiedlich starke Veränderung der IFN $\gamma$ -Produktion in Abhängigkeit der Stimulation beobachtet werden. Gezeigt wurde, dass die Stimulation mit anti-CD3-/CD28-Antikörpern zu einer sehr hohen Produktion von IFN $\gamma$  führt. Der anti-inflammatorische Effekt des

HDAC-Inhibitors jedoch, der nach ConA-Stimulation reproduzierbar erzielt werden konnte, ist bei dieser Stimulationsform nicht zu beobachten. Beide Formen der Stimulation (anti-CD3/CD28-Antikörper und ConA) setzen an unterschiedlichen Orten der Zelle an und wirken auf unterschiedliche Weise um den Signalweg des TZR zu stimulieren [79, 80].

Mehrere andere Untersuchungen haben Unterschiede in der durch die beiden Stimulationsformen induzierten IFN $\gamma$ -Produktion von T-Zellen festgestellt [81, 82]. Eine weitere Arbeit zeigt Unterschiede in der Proliferations- und Überlebensfähigkeit von PBMC [83]. Die exakten Unterschiede in der Aktivierung der Signaltransduktion durch die beiden Stimulationsformen wurden bisher noch nicht herausgearbeitet. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde diese Fragestellung nicht weiter verfolgt, primäres Ziel war es, den anti-inflammatorischen Mechanismus zu identifizieren. Daher wurde in allen nachfolgenden Experimenten ConA zur T-Zellstimulation verwendet.

Unabhängig von den variierenden Ergebnissen je nach Stimulationsform konnte durch die Hemmung der IFN $\gamma$ -Produktion durch den HDAC-Inhibitor ITF2357 für CD4<sup>+</sup>-T-Zellen erstmals gezeigt werden, dass der Inhibitor für diesen Zelltyp anti-inflammatorisches Wirkpotential besitzt. Dieser Effekt wurde für andere Zellen wie Splenozyten und Makrophagen in verschiedenen Arbeiten zuvor gezeigt [22, 26, 27].

### **5.3 Einfluss des HDAC-Inhibitors auf T-Zellpolarisierung**

Neben einem direkten Einfluss auf Effektorzellen besteht ebenso die Möglichkeit, dass bereits die Polarisierung beeinflusst wird, und somit *in vivo* bereits im Lymphknoten zu einem der frühestmöglichen Zeitpunkte direkt in die Immunantwort eingegriffen werden könnte. Bei der Charakterisierung der Wirkung auf die Polarisierung zu Th1-Zellen konnte eine konzentrationsabhängige Zunahme der IFN $\gamma$ -Produktion beobachtet werden. Dieser Effekt ist gut mit den 2002 von Messi publizierten Daten vereinbar, der eine Promotorazetylierung als essentiellen Faktor in der Polarisierung von Th1-Zellen beschreibt [84]. Im Einklang mit diesen Ergebnissen stehen unpublizierte Daten der Arbeitsgruppe, die eine Azetylierung des IFN $\gamma$ -Promotors unter dem Einfluss von ITF2357 zeigen.

Die anti-inflammatorische Wirkung des Inhibitors auf CD4<sup>+</sup>-T-Zellen kann mit diesen Beobachtungen jedoch nicht erklärt werden. Hier müssen verschiedene Untersuchungen des Effektes von HDACi auf andere Th-Zellsubpopulationen als Erklärung für ihr anti-inflammatorisches Potential herangezogen werden.

So zeigen weitere in der Arbeitsgruppe generierte Daten, dass die Behandlung von FoxP3<sup>+</sup>-Zellen mit ITF2357 zu einer deutlichen Zunahme dieser T-Zellsubpopulation führt [85]. Dies steht in Einklang mit den von Tao 2007 publizierten Daten, die nach Behandlung mit einem HDACi *in vivo* eine erhöhte FoxP3-Genexpression sowie eine Zunahme der T<sub>reg</sub>-Populationen gezeigt haben [63].

Ebenfalls gezeigt werden konnte, dass durch die Behandlung mit dem HDAC-Inhibitor Einfluss auf die Th17-Zellen, denen vor allem in der Entstehung von Autoimmunerkrankungen eine Schlüsselrolle zugesprochen wird, genommen werden kann. Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass ITF2357 zum einen direkt die Th17 Polarisierung hemmt. Zum anderen konnte ebenfalls gezeigt werden, dass es *in vivo* durch die Behandlung mit dem Inhibitor in Mäusen mit experimenteller Kolitis in der Lamina propria zu einer Reduktion der Th17-Zellen kommt. Gestützt werden diese Daten durch die Beobachtung, dass die Behandlung mit ITF2357 bei NZB/W Mäusen, die im Alter von 6-9 Monaten eine Lupusnephritis entwickeln, zu einer Reduktion der IL-17 produzierenden T-Zellen kommt [86].

In dem in dieser Arbeit verwendeten Zellgemisch von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen befindet sich ein Anteil von etwa 10% regulatorischen T-Zellen. Die zuvor beschriebene anti-inflammatorische Wirkung von ITF2357, charakterisiert durch die Abnahme der IFN $\gamma$ -Produktion in unserem Versuchsaufbau, wäre somit durch die Anwesenheit der regulatorischen T-Zellen gut erklärbar. Der endgültige Beweis, z.B. in FoxP3-defizienten Zellen steht aus.

### **5.4 Einfluss der HDACi auf den IL-6R**

Wie zuvor diskutiert haben HDACi einen Einfluss auf die Polarisierung sowie das Gleichgewicht einzelner T-Zellsubpopulationen und haben somit großes Potential als mögliche Substanzen in der Behandlung von Autoimmunkrankheiten eingesetzt zu werden. Diese Theorie untermauern verschiedene Publikationen in denen

beschrieben wird, dass die Hemmung von HDAC zu einer Verbesserung einer Kolitis im Mausmodell führt [22, 63].

Weitestgehend unverstanden ist der dahinterliegende Mechanismus. Folgt man jedoch der Theorie, dass Th17-Zellen die entzündlichen Prozesse in der Lamina propria negativ beeinflussen [87, 88], folgt im nächsten Schritt die Frage danach, wie die Bildung von Th17-Zellen beeinflusst wird. Hier konnte IL-6 als das entscheidende Zytokin identifiziert werden, es entfaltet seine Wirkung in naiven T-Zellen über den membranständigen IL-6R, den nur wenige Zellen exprimieren. In dieser Arbeit wurde der Einfluss von ITF2357 auf den IL-6R von naiven T-Zellen untersucht und mit der beobachteten anti-inflammatorischen Wirkung eine mechanistische Erklärung für den Effekt der HDACi beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass bei naiven CD4<sup>+</sup>-T-Zellen die Expression des IL-6R auf mRNA-Ebene in Anwesenheit von ITF2357 herabreguliert wird. Diese Beobachtung unterstützend konnte mittels CHIP am IL-6R Genlocus eine Hyperazetylierung nach Inkubation mit dem Inhibitor gezeigt werden. Weiterführende Untersuchungen der Arbeitsgruppe konnten den Effekt von ITF2357 entlang der Signalkaskade von IL-6 und dem IL-6R bestätigen. So zeigte sich nach Behandlung mit dem Inhibitor eine Phosphorylierung von STAT3, einem Schlüsselmolekül des IL-6/IL-6R-Signalwegs [85]. Auch ROR $\gamma$ T, der entscheidende Transkriptionsfaktor für die Polarisierung zu Th17-Zellen wurde durch die Behandlung der naiven T-Zellen mit ITF2357 herabreguliert [85]. Die in dieser Arbeit erhobenen Daten zusammen mit der existierenden Literatur lassen den Schluss zu, dass der IL-6/STAT3-Signalweg für die anti-inflammatorische Wirkung der HDACi eine kritische Rolle spielt. Damit übereinstimmend konnte in multiplen Myelom-Zellen gezeigt werden dass die Inkubation mit HDACi zu einer Hemmung des IL-6R-Signalweges führt [73, 89]. Dieser Ansatz wurde bereits weiter entwickelt, so existieren klinische Studien, in welchen HDACi zur Behandlung von Myelom-Rezidiven eingesetzt werden. Die HDACi könnten so mit dem IL-6R als Zielmolekül einen neuen therapeutischen Ansatz in der Behandlung von malignen sowie Autoimmun-Erkrankungen darstellen.

### **5.5 Einsatz der RNA Interferenz zur Charakterisierung der spezifischen Wirkung einzelner HDAC**

Da den einzelnen HDAC verschiedene spezifische Funktionen und Charakteristika zugeschrieben werden können, wurde in einem nächsten Schritt angestrebt



herauszufinden welche HDAC für die beobachteten Effekte verantwortlich sind. Mit dem eingesetzten Inhibitor ITF2357 wurde eine Inhibition aller HDAC untersucht. Deshalb sollte in den weiteren Versuchen jeweils der Effekt durch die Hemmung einzelner HDAC genauer charakterisiert werden. Die Auswahl der untersuchten HDAC erfolgte unter anderem über ihre Zugehörigkeit zu verschiedenen HDAC Klassen. In der Literatur konnte gezeigt werden, dass die HDAC Klasse II auch bei der Beteiligung induzierbarer zellulärer Vorgänge wie Zellaktivierung oder Zytokinproduktion von Bedeutung sind [90, 91]. Da HDAC Klasse II im Gegensatz zu den konstitutiv im Zellkern exprimierten HDAC der Klasse I induzierbar zwischen Zellkern und Zytoplasma pendeln können, wurden diese ausgewählt, um ihre Rolle bei der Aktivierung adulter Zellen zu untersuchen.

Ein anderes Kriterium zur Auswahl stellten differentielle Expressionsdaten dar, die im Rahmen von Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe erhoben wurden. Die Untersuchung verschiedener T-Zellsubpopulation auf Expression einzelner HDAC zeigte hier, dass für T-Zellen die HDAC5, 7, 9, 10 und 11 von besonderem Interesse sein könnten.

Als Vertreter der HDAC Klasse I wurde HDAC1 ausgewählt und untersucht. HDAC1 ist fast vollständig identisch mit HDAC2. Wie die anderen Vertreter ihrer Klasse werden diese HDAC ubiquitär exprimiert [92].

Zur Untersuchung der spezifischen Wirkung einzelner HDAC wurde die siRNA Technologie herangezogen. Im Rahmen dieser Versuche wurden CD4<sup>+</sup>-T-Zellen mit spezifischer siRNA transfiziert. Diese Transfektion von Zellen resultiert in einem wirkungsvollen, vorübergehenden, posttranskriptionellen Ausschalten spezifischer Gene [93]. Der Einsatz von siRNA gilt als effektive Methode bei der Hemmung der Expressionshöhe der Ziel-mRNA und den daraus entstehenden Proteinen [94].

In der hier vorliegenden Arbeit fand die Transfektion mit Hilfe von Elektroporation statt. Vor allem für primäre Zellen wie auch für schwer zu transfizierende Zelllinien hat sich diese Methode als die überlegene erwiesen, da sie effizienter und außerdem im Vergleich zur Lipofektion Zellzyklus unabhängig ist [95, 96]. Außerdem wurde im Gegensatz zum Einsatz von Lipofektion kaum eine erhöhte Interferon-Antwort beschrieben [97]. Da die Dauer sowie die Stärke des applizierten Impulses bei der

Elektroporation eine entscheidende Bedeutung besitzen, wurden, um ein optimales Ergebnis zu erzielen, beide Parameter variiert. Je höher die eingesetzte Voltzahl ist, desto größer wird der durch die Elektroporation veränderte Bereich der Zellmembran [98]. Entscheidend ist es aber auch eine Spannung zu wählen, bei der die Zellen einen möglichst geringen Schaden nehmen. So war es notwendig eine möglichst geringe Voltzahl zu verwenden bei der trotz allem noch eine hohe Transfektionseffizienz erreicht wurde.

Für die Transfektion von Präadipozyten wurde in der Arbeitsgruppe bereits eine Methode etabliert [99]. Der applizierte Impuls betrug hier 600 V für 600  $\mu$ s. An diesen Bedingungen orientiert, wählten wir drei verschiedene Voltzahlen aus, die an den von uns verwendeten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen getestet wurden.

Dabei konnte festgestellt werden, dass zumindest in dem von uns untersuchten Bereich von 500, 600 und 700 V die Höhe der Voltzahl und somit Ausdehnung der veränderten Zellmembran keinen weiteren Einfluss auf die Effizienz der Transfektion hatte. Die Länge des applizierten Impulses entscheidet über das Ausmaß der Permeabilisierung [98]. Auch hier wurden drei verschiedene Impulslängen innerhalb eines vorher festgelegten Rahmens untersucht. Da mit zunehmender Impulslänge eine Abnahme der IFN $\gamma$ -Konzentration beobachtet wurde, kann davon ausgegangen werden, dass die Größe der durch die Elektroporation erreichten Membranöffnung positiv mit der erreichten Transfektionseffizienz korreliert. Es gelang so die geeigneten Bedingungen für die von uns verwendeten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zu entwickeln.

Da nicht jede ausgewählte siRNA die nötigen Anforderungen erfüllt und die Expression der Zielproteine in ausreichendem Maße hemmt, muss jede siRNA vor dem Einsatz im Experiment auf ihre Wirksamkeit untersucht werden [100]. Die unterschiedliche Effizienz der verschiedenen siRNA ist unter anderem darin begründet, dass für die zu hemmende mRNA des Zielgens verschiedene siRNA mit vielen möglichen Sequenzen existieren, die jeweils unterschiedliche Angriffspunkte an der Ziel-mRNA haben. Schon kleine Modifikationen von zwei Basen an der Ziel-mRNA können zu einer signifikanten Veränderung der siRNA Wirksamkeit führen [101]. Bei den hier vorliegenden Versuchen wurde eine siRNA als effizient eingestuft, wenn sie unter der Verwendung eines Elektroporationsimpulses mit einer Stärke von 500 V und einer Länge von 400  $\mu$ s eine Hemmung von mindestens 50% erzielte.

Da in unserer Evaluation der Effizienz der einzelnen siRNA nicht für alle HDAC eine entsprechend wirksame gefunden werden konnte, wurden in einigen Fällen zwei siRNAs kombiniert eingesetzt. Durch die unterschiedlichen Sequenzen der verschiedenen siRNAs ergeben sich bei deren gemeinsamen Einsatz mehr Bindungsstellen und somit erhöht sich die Bindungswahrscheinlichkeit. Dieses Konzept zur Verbesserung der siRNA - Effizienz wurde von mehreren Gruppen in verschiedenen Zelllinien erfolgreich eingesetzt [102, 103]. Dies führt in vielen Fällen zu einer effektiveren Hemmung der mRNA-Expressionshöhe. In der hier vorliegenden Arbeit war der Einsatz zweier kombinierter siRNA für die HDAC5, 6 und 7 erforderlich.

Die Auswahl der richtigen siRNA sowie eine hohe Transfektionseffizienz reichen nicht aus, um die bestmöglichen Versuchsbedingungen zu schaffen, auch der Zeitpunkt der Analyse der Hemmung der Expression muss richtig gewählt sein. Die Halbwertszeit der untersuchten mRNA und der dazugehörigen Proteine kann zwischen Stunden und Tagen variieren. Es gibt Arbeiten, die Effekte der siRNA bereits nach 6 – 24 h [103] messen, während andere Arbeiten einen Effekt erst nach 72 h nachweisen konnten [56].

Für die meisten Zielgene hat sich eine Inkubationszeit von 24 bis 48 h nach Transfektion für sinnvoll erwiesen [104]. Aus diesem Grund wurden diese zwei Zeitpunkte gewählt, um jeweils die Effizienz der Hemmung durch die siRNA zu überprüfen. Aufgrund der von uns ermittelten Ergebnisse (4.3.2), dass die Hemmung der mRNA nach 24 h bei 71% lag, während nach 48 h nur noch eine Hemmung von 35% nachzuweisen war, wurde für die weiteren Versuche der Zeitpunkt von 24 h nach Transfektion für die Lyse und weitere Aufarbeitung der Zellen gewählt.

Durch den Einsatz spezifischer siRNA wurde die Expression ausgewählter HDAC in CD4<sup>+</sup>-T-Zellen gehemmt. Bei diesen Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass vor allem die Hemmung von HDAC5, 7 und 9 zu einer signifikant geringeren IFN $\gamma$ -Konzentration im Überstand führt, während die Hemmung anderer HDAC nicht zu einer veränderten Zytokin-Konzentration führt. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass diese HDAC der Klasse II eine wichtige Rolle in der Vermittlung inflammatorischer Prozesse spielen bei CD4<sup>+</sup>-T-Zellen spielen.

## 5.6 Funktionelle Relevanz von HDAC5, HDAC7 und HDAC9

HDAC5 und HDAC9 sind stark in Muskeln, im Herzen und im Gehirn angereichert [105]. Zur Bedeutung von HDAC5 in immunologischen Fragestellungen ist bisher wenig bekannt. Festgestellt wurde jedoch, dass Histonazetylierung eine wichtige Rolle in der Regulation von pro-inflammatorischer Genexpression in mit *Legionella pneumophila* infizierten Lungenepithelzellen zu spielen scheint [106]. HDAC5 zeigt sich hier von besonderer Bedeutung, da die Expression durch *Legionella pneumophila* induziert wird. Es scheint also, als ob HDAC5 in verschiedenen Zellpopulationen eine Rolle in der inflammatorischen Antwort spielt, auch wenn der Mechanismus dieses Enzyms in diesen Prozessen noch nicht genauer untersucht wurde.

HDAC9 wird eine zentrale Funktion bei regulatorischen T-Zellen zugesprochen und ist das HDAC mit der stärksten Expression in diesem T-Zellsubtyp [63]. Die Aktivierung von regulatorischen T-Zellen führt zu einer Translokation von HDAC9 in das Zytoplasma und ist für die regulatorische Funktion dieser Zellpopulation essentiell [63]. Einen weiteren Hinweis für die Bedeutung von HDAC9 in Entzündungsprozessen liefert die Arbeit von de Zoeten aus dem Jahr 2010, in der gezeigt wird, dass HDAC9<sup>-/-</sup>-Mäuse bei der experimentellen Kolitis im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen geschützt sind [107]. Bedenkt man den relevanten Anteil an Tregs in den untersuchten Zellpopulationen, so lässt sich feststellen, dass in der vorliegende Arbeit die von de Zoeten et al. beschriebene Funktion von HDAC9 zumindest indirekt bestätigt wird. Ob auch weitere Th-Zellsubtypen HDAC9-Funktionen aufweisen, wird in weiteren Experimenten zu klären sein.

In Endothelzellen findet man eine hohe Expression von HDAC7, besonders in der Entwicklung von Blutgefäßen und deren Stabilität ist es von Bedeutung. Von immunologischer Relevanz ist die vermehrte Expression von HDAC7 in Thymozyten, wo es sowohl auf die positive als auch auf die negative Selektion während der Entwicklung im Thymus Einfluss nimmt. In diesem Zusammenhang wird HDAC7 auch ein Einfluss auf die Apoptose-Regulation zugesprochen, denn die Hemmung von HDAC7 durch RNA-Interferenz führt zu einer Erhöhung der Apoptose in Thymozyten [108].

Eine weitere Funktion von HDAC7 konnte auch in adulten Lymphozyten nachgewiesen werden. So ist HDAC7 in regulatorischen T-Zellen als Teil des für die Transkription verantwortlichen Enzymkomplexes im Zellkern beschrieben worden. In diesem Zusammenhang supprimiert HDAC7 zusammen mit der Histonazetyltransferase TIP60 und FoxP3 die IL-2-Produktion der Zellen [109]. Dieser Effekt wurde bisher nur in transfizierten T-Zelllinien (Jurkat) gezeigt. Eine Rolle von HDAC7 in der Repressor-Funktion von Tregs auf aktivierte Zellen konnte bisher noch nicht beschrieben werden. Gleichwohl ist IL-2 notwendig für die Funktion und Expansion aktivierter Th-Zellen. Eine verminderte Expression dieses Zytokins würde auch eine verminderte IFN $\gamma$ -Expression in dem vorliegenden Versuchsaufbau erklären.

Mit den in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse, dass die spezifische Hemmung von HDAC5, 7 und 9 zu einer signifikant verringerten IFN $\gamma$ -Produktion im Vergleich zur Hemmung durch die Kontroll-siRNA führt, konnte für die HDAC5 und 7 erstmals gezeigt werden, dass diese in der Vermittlung inflammatorischer Prozesse in CD4<sup>+</sup>-T-Zellen eine entscheidende Rolle spielen.

In einem nächsten Schritt wäre es interessant diese spezifischen Eigenschaften genauer zu charakterisieren und in Entzündungsmodellen die *in vivo* - Relevanz zu identifizieren. Für diese und weitere Versuche stehen unserer Arbeitsgruppe nun HDAC5 - Knockout (KO) Mäuse zur Verfügung. Durch den Einsatz dieser Mäuse ergeben sich einige entscheidende experimentelle Vorteile. Zum einen wird dadurch ein totales Ausschalten des jeweiligen Gens gewährleistet, im Gegensatz zur teilweisen sowie temporären Hemmung des Zielgens durch den Einsatz von siRNA, zum anderen erlaubt es die funktionelle Charakterisierung *in vivo*.

## 6 Schlussfolgerung und Ausblick

In den letzten Jahren hat neben der klassischen Genetik ebenfalls die Epigenetik stark an Bedeutung gewonnen. Ob eine Erbinformation tatsächlich über die Proteinbiosynthese in einen Organismus eingeht, wird über Prozesse mitbestimmt, die weit jenseits der reinen DNA-Sequenz liegen, dies wird unter dem Überbegriff der Epigenetik zusammengefasst. Zu den epigenetischen Veränderungen zählen die Modifikationen der Histone. Bei den Histonen handelt es sich um Teile des Verpackungssystems der DNA. Die als Chromatin kondensierte DNA ist im Zellkern um basische Proteine, die Histone, gewickelt. Jeweils ein Komplex aus den Histonproteinen H2A, H2B, H3 und H4 bilden gemeinsam mit dem Chromatin ein Nukleosom, als nächste übergeordnete Einheit folgt das Chromosom.

Die Histonenden können über Histonazetyltransferasen bzw. Histon-Deazetylasen azetyliert, bzw. deazetyliert werden. Hierüber kann die Transkription einzelner Gene reguliert werden. Eine Azetylierung bedeutet eine vermehrte Transkription, während die Deazetylierung eine Herunterregulation der Transkription eines bestimmten Gens bewirkt.

Mit Histon-Deazetylase (HDAC)-Inhibitoren kann in die Histonmodifikation regulierend eingegriffen werden. Für die HDAC-Inhibitoren ist schon seit längerem eine anti-proliferative Wirkung beschrieben, was ihnen inzwischen eine Rolle in der Therapie maligner Erkrankungen geschaffen hat. Zusätzlich konnte in neueren Arbeiten wiederholt eine anti-inflammatorische Wirkung der HDAC-Inhibitoren gezeigt werden, so unter anderem in verschiedenen Modellen experimenteller Kolitis, rheumatoider Arthritis sowie in entzündungsassoziierten Tumormodellen.

In dieser Arbeit wurde mit dem Pan-HDAC-Inhibitor ITF2357 gearbeitet, welcher der Klasse der Hydroxaminsäuren angehört. Es handelt sich um einen Inhibitor, der die Histondeazetylasen der Klasse I sowie der Klasse II inhibiert. Untersucht werden sollte zum einen ob der HDAC-Inhibitor die T-Zellpolarisierung beeinflusst und zum anderen welche Bedeutung spezifischen HDAC in der Vermittlung anti-inflammatorischer Prozesse zugerechnet werden kann.

Ziel war es zugrundeliegende Mechanismen für die beobachteten anti-inflammatorischen Effekte zu identifizieren. Zunächst wurde die Wirkung von

ITF2357 auf CD4<sup>+</sup>-T-Zellen untersucht und hier eine inhibitorische Wirkung auf die IFN $\gamma$ -Produktion als pro-inflammatorischer Marker nachgewiesen. Es konnte dann gezeigt werden, dass der Einsatz des Inhibitors auf die Polarisierung von naiven T-Zellen zu Th1-Zellen zu einer Zunahme der IFN $\gamma$  produzierenden Zellen führt.

Da im selben Labor auch gezeigt wurde, dass ITF2357 direkt die Th17 Polarisierung hemmt und es durch den Einsatz des Inhibitors zu einer Reduktion der Th17-Zellen in der Lamina propria in Mäusen mit experimenteller Kolitis kommt und diesen eine Schlüsselrolle in der Entstehung von Autoimmunerkrankungen zukommt, wurde in einem nächsten Schritt der Einfluss des Inhibitors auf die IL-6R mRNA-Expression untersucht. Da IL-6 das entscheidende Zytokin für die Polarisierung von Th17-Zellen darstellt. In diesen Versuchen konnte eine Abnahme der IL-6R mRNA-Expression auf naiven T-Zellen nach Behandlung mit ITF2357 gezeigt werden.

Um die Spezifität des therapeutischen Ansatzes von Histon-Deazetylase-Inhibitoren zu verbessern, kam in dem zweiten Abschnitt der Arbeit die siRNA-Technologie zum Einsatz. Die spezifische Hemmung von HDAC5, 7 und 9 führte zu einer signifikant verringerten IFN $\gamma$ -Produktion im Vergleich zur Hemmung durch die Kontroll-siRNA. Damit konnte für die HDAC5 und 7 und 9 erstmals gezeigt werden, dass diese in der Vermittlung inflammatorischer Prozesse in CD4<sup>+</sup>-T-Zellen eine entscheidende Rolle spielen. Dies ist nicht nur für die Entwicklung spezifischer Therapieansätze sondern gleichermaßen für das Verständnis der Funktion der einzelnen HDAC von Bedeutung.

Die vorliegende Arbeit konnte damit zeigen, dass die Inhibition von HDAC die Polarisation naiver T-Zellen beeinflusst und damit anti-inflammatorische Effekte vermittelt. Darüber hinaus konnten HDAC 5, 7 und 9 als zentrale HDAC für die Vermittlung dieser Effekte identifiziert werden. Damit stellen diese HDAC interessante Zielstrukturen für die Entwicklung neuer Therapieansätze dar. Der parallele anti-proliferative und anti-inflammatorische Effekt ist hierbei insbesondere für Erkrankungen wie z.B. der Colitis ulcerosa von Bedeutung, bei denen eine chronische Entzündung mit einem erhöhten Risiko für eine maligne Entartung assoziiert werden konnte.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Olins, A.L. and D.E. Olins, *Spheroid chromatin units (v bodies)*. Science, 1974. **183**(4122): p. 330-2.
2. Luger, K., *Structure and dynamic behavior of nucleosomes*. Curr Opin Genet Dev, 2003. **13**(2): p. 127-35.
3. Bjerling, P., R.A. Silverstein, G. Thon, A. Caudy, S. Grewal, and K. Ekwall, *Functional divergence between histone deacetylases in fission yeast by distinct cellular localization and in vivo specificity*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(7): p. 2170-81.
4. Wade, P.A., *Transcriptional control at regulatory checkpoints by histone deacetylases: molecular connections between cancer and chromatin*. Hum Mol Genet, 2001. **10**(7): p. 693-8.
5. Ito, K., P.J. Barnes, and I.M. Adcock, *Glucocorticoid receptor recruitment of histone deacetylase 2 inhibits interleukin-1beta-induced histone H4 acetylation on lysines 8 and 12*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(18): p. 6891-903.
6. Forsberg, E.C. and E.H. Bresnick, *Histone acetylation beyond promoters: long-range acetylation patterns in the chromatin world*. Bioessays, 2001. **23**(9): p. 820-30.
7. Spencer, V.A. and J.R. Davie, *Role of covalent modifications of histones in regulating gene expression*. Gene, 1999. **240**(1): p. 1-12.
8. Grunstein, M., *Histone acetylation in chromatin structure and transcription*. Nature, 1997. **389**(6649): p. 349-52.
9. Khan, N., M. Jeffers, S. Kumar, C. Hackett, F. Boldog, N. Khramtsov, X. Qian, E. Mills, S.C. Berghs, N. Carey, P.W. Finn, L.S. Collins, A. Tumber, J.W. Ritchie, P.B. Jensen, H.S. Lichenstein, and M. Sehested, *Determination of the class and isoform selectivity of small-molecule histone deacetylase inhibitors*. Biochem J, 2008. **409**(2): p. 581-9.
10. Gregoret, I.V., Y.M. Lee, and H.V. Goodson, *Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis*. J Mol Biol, 2004. **338**(1): p. 17-31.
11. Buggy, J.J., M.L. Sideris, P. Mak, D.D. Lorimer, B. McIntosh, and J.M. Clark, *Cloning and characterization of a novel human histone deacetylase, HDAC8*. Biochem J, 2000. **350 Pt 1**: p. 199-205.
12. Galasinski, S.C., K.A. Resing, J.A. Goodrich, and N.G. Ahn, *Phosphatase inhibition leads to histone deacetylases 1 and 2 phosphorylation and disruption of corepressor interactions*. J Biol Chem, 2002. **277**(22): p. 19618-26.
13. Peterson, C.L., *HDAC's at work: everyone doing their part*. Mol Cell, 2002. **9**(5): p. 921-2.
14. Lagger, G., D. O'Carroll, M. Rembold, H. Khier, J. Tischler, G. Weitzer, B. Schuettengruber, C. Hauser, R. Brunmeir, T. Jenuwein, and C. Seiser, *Essential function of histone deacetylase 1 in proliferation control and CDK inhibitor repression*. Embo J, 2002. **21**(11): p. 2672-81.
15. Marks, P.A., V.M. Richon, and R.A. Rifkind, *Histone deacetylase inhibitors: inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells*. J Natl Cancer Inst, 2000. **92**(15): p. 1210-6.
16. Glozak, M.A., N. Sengupta, X. Zhang, and E. Seto, *Acetylation and deacetylation of non-histone proteins*. Gene, 2005. **363**: p. 15-23.



17. Marks, P., R.A. Rifkind, V.M. Richon, R. Breslow, T. Miller, and W.K. Kelly, *Histone deacetylases and cancer: causes and therapies*. Nat Rev Cancer, 2001. **1**(3): p. 194-202.
18. de Ruijter, A.J., A.H. van Gennip, H.N. Caron, S. Kemp, and A.B. van Kuilenburg, *Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family*. Biochem J, 2003. **370**(Pt 3): p. 737-49.
19. Butler, L.M., X. Zhou, W.S. Xu, H.I. Scher, R.A. Rifkind, P.A. Marks, and V.M. Richon, *The histone deacetylase inhibitor SAHA arrests cancer cell growth, up-regulates thioredoxin-binding protein-2, and down-regulates thioredoxin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(18): p. 11700-5.
20. Zhang, C., V. Richon, X. Ni, R. Talpur, and M. Duvic, *Selective induction of apoptosis by histone deacetylase inhibitor SAHA in cutaneous T-cell lymphoma cells: relevance to mechanism of therapeutic action*. J Invest Dermatol, 2005. **125**(5): p. 1045-52.
21. Leoni, F., A. Zaliani, G. Bertolini, G. Porro, P. Pagani, P. Pozzi, G. Dona, G. Fossati, S. Sozzani, T. Azam, P. Bufler, G. Fantuzzi, I. Goncharov, S.H. Kim, B.J. Pomerantz, L.L. Reznikov, B. Siegmund, C.A. Dinarello, and P. Mascagni, *The antitumor histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid exhibits antiinflammatory properties via suppression of cytokines*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(5): p. 2995-3000.
22. Glauben, R., A. Batra, I. Fedke, M. Zeitz, H.A. Lehr, F. Leoni, P. Mascagni, G. Fantuzzi, C.A. Dinarello, and B. Siegmund, *Histone hyperacetylation is associated with amelioration of experimental colitis in mice*. J Immunol, 2006. **176**(8): p. 5015-22.
23. Maeda, T., M. Towatari, H. Kosugi, and H. Saito, *Up-regulation of costimulatory/adhesion molecules by histone deacetylase inhibitors in acute myeloid leukemia cells*. Blood, 2000. **96**(12): p. 3847-56.
24. Clinicaltrials. 2011; Available from: <http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=ITF2357>.
25. Glauben, R., E. Sonnenberg, M. Zeitz, and B. Siegmund, *HDAC inhibitors in models of inflammation-related tumorigenesis*. Cancer Lett, 2009. **280**(2): p. 154-9.
26. Leoni, F., G. Fossati, E.C. Lewis, J.K. Lee, G. Porro, P. Pagani, D. Modena, M.L. Moras, P. Pozzi, L.L. Reznikov, B. Siegmund, G. Fantuzzi, C.A. Dinarello, and P. Mascagni, *The histone deacetylase inhibitor ITF2357 reduces production of pro-inflammatory cytokines in vitro and systemic inflammation in vivo*. Mol Med, 2005. **11**(1-12): p. 1-15.
27. Glauben, R., A. Batra, T. Stroh, U. Erben, I. Fedke, H.A. Lehr, F. Leoni, P. Mascagni, C.A. Dinarello, M. Zeitz, and B. Siegmund, *Histone deacetylases: novel targets for prevention of colitis-associated cancer in mice*. Gut, 2008.
28. Golay, J., L. Cuppini, F. Leoni, C. Mico, V. Barbui, M. Domenghini, L. Lombardi, A. Neri, A.M. Barbui, A. Salvi, P. Pozzi, G. Porro, P. Pagani, G. Fossati, P. Mascagni, M. Introna, and A. Rambaldi, *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**(9): p. 1892-900.
29. Vojinovic, J., Dinarello, C.A., Damjanov, N., and Oldoni, T., *Safety and efficacy of oral ITF 2357 in patients with active systemic onset juvenile idiopathic arthritis (SOJIA) Results of a phase II, open label, international, multi-centre clinical trial*. Arthritis Rheum., 2008.

30. Norment, A.M., R.D. Salter, P. Parham, V.H. Engelhard, and D.R. Littman, *Cell-cell adhesion mediated by CD8 and MHC class I molecules*. Nature, 1988. **336**(6194): p. 79-81.
31. Mosmann, T.R., H. Cherwinski, M.W. Bond, M.A. Giedlin, and R.L. Coffman, *Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins*. J Immunol, 1986. **136**(7): p. 2348-57.
32. Zinkernagel, R.M. and P.C. Doherty, *Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system*. Nature, 1974. **248**(450): p. 701-2.
33. Zinkernagel, R.M. and P.C. Doherty, *Immunological surveillance against altered self components by sensitised T lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis*. Nature, 1974. **251**(5475): p. 547-8.
34. Coyle, A.J. and J.C. Gutierrez-Ramos, *The expanding B7 superfamily: increasing complexity in costimulatory signals regulating T cell function*. Nat Immunol, 2001. **2**(3): p. 203-9.
35. Harrington, L.E., R.D. Hatton, P.R. Mangan, H. Turner, T.L. Murphy, K.M. Murphy, and C.T. Weaver, *Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages*. Nat Immunol, 2005. **6**(11): p. 1123-32.
36. Park, H., Z. Li, X.O. Yang, S.H. Chang, R. Nurieva, Y.H. Wang, Y. Wang, L. Hood, Z. Zhu, Q. Tian, and C. Dong, *A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17*. Nat Immunol, 2005. **6**(11): p. 1133-41.
37. Veldhoen, M., C. Uyttenhove, J. van Snick, H. Helmbj, A. Westendorf, J. Buer, B. Martin, C. Wilhelm, and B. Stockinger, *Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset*. Nat Immunol, 2008. **9**(12): p. 1341-6.
38. Rowell, E. and C.B. Wilson, *Programming perpetual T helper cell plasticity*. Immunity, 2009. **30**(1): p. 7-9.
39. Swain, S.L., A.D. Weinberg, M. English, and G. Huston, *IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors*. J Immunol, 1990. **145**(11): p. 3796-806.
40. Trinchieri, G., *Interleukin-12 and its role in the generation of TH1 cells*. Immunol Today, 1993. **14**(7): p. 335-8.
41. Neurath, M.F., S. Finotto, and L.H. Glimcher, *The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity*. Nat Med, 2002. **8**(6): p. 567-73.
42. Murphy K., T.P., Walport M., *Janeway Immunologie*. Vol. 7. 2009.
43. Stockinger, B. and M. Veldhoen, *Differentiation and function of Th17 T cells*. Curr Opin Immunol, 2007. **19**(3): p. 281-6.
44. Veldhoen, M., R.J. Hocking, R.A. Flavell, and B. Stockinger, *Signals mediated by transforming growth factor-beta initiate autoimmune encephalomyelitis, but chronic inflammation is needed to sustain disease*. Nat Immunol, 2006. **7**(11): p. 1151-6.
45. Schwartz, R.H., *Natural regulatory T cells and self-tolerance*. Nat Immunol, 2005. **6**(4): p. 327-30.
46. Fontenot, J.D., M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky, *Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells*. Nat Immunol, 2003. **4**(4): p. 330-6.

47. Wildin, R.S., S. Smyk-Pearson, and A.H. Filipovich, *Clinical and molecular features of the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome*. J Med Genet, 2002. **39**(8): p. 537-45.
48. Mucida, D., Y. Park, G. Kim, O. Turovskaya, I. Scott, M. Kronenberg, and H. Cheroutre, *Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid*. Science, 2007. **317**(5835): p. 256-60.
49. Fantini, M.C., A. Rizzo, D. Fina, R. Caruso, C. Becker, M.F. Neurath, T.T. Macdonald, F. Pallone, and G. Monteleone, *IL-21 regulates experimental colitis by modulating the balance between Treg and Th17 cells*. Eur J Immunol, 2007. **37**(11): p. 3155-63.
50. Chen, W., W. Jin, N. Hardegen, K.J. Lei, L. Li, N. Marinos, G. McGrady, and S.M. Wahl, *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**(12): p. 1875-86.
51. Hibi, M., M. Murakami, M. Saito, T. Hirano, T. Taga, and T. Kishimoto, *Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130*. Cell, 1990. **63**(6): p. 1149-57.
52. Rose-John, S. and P.C. Heinrich, *Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function*. Biochem J, 1994. **300 ( Pt 2)**: p. 281-90.
53. van der Krol, A.R., L.A. Mur, M. Beld, J.N. Mol, and A.R. Stuitje, *Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression*. Plant Cell, 1990. **2**(4): p. 291-9.
54. Fire, A., S. Xu, M.K. Montgomery, S.A. Kostas, S.E. Driver, and C.C. Mello, *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans*. Nature, 1998. **391**(6669): p. 806-11.
55. Bernstein, E., A.A. Caudy, S.M. Hammond, and G.J. Hannon, *Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference*. Nature, 2001. **409**(6818): p. 363-6.
56. Hammond, S.M., E. Bernstein, D. Beach, and G.J. Hannon, *An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells*. Nature, 2000. **404**(6775): p. 293-6.
57. Caudy, A.A., M. Myers, G.J. Hannon, and S.M. Hammond, *Fragile X-related protein and VIG associate with the RNA interference machinery*. Genes Dev, 2002. **16**(19): p. 2491-6.
58. Tuschl, T. and A. Borkhardt, *Small interfering RNAs: a revolutionary tool for the analysis of gene function and gene therapy*. Mol Interv, 2002. **2**(3): p. 158-67.
59. Gehl, J., *Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research*. Acta Physiol Scand, 2003. **177**(4): p. 437-47.
60. Neumann, E., M. Schaefer-Ridder, Y. Wang, and P.H. Hofschneider, *Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields*. Embo J, 1982. **1**(7): p. 841-5.
61. Takahashi, M., T. Furukawa, H. Saitoh, A. Aoki, T. Koike, Y. Moriyama, and A. Shibata, *Gene transfer into human leukemia cell lines by electroporation: experience with exponentially decaying and square wave pulse*. Leuk Res, 1991. **15**(6): p. 507-13.
62. Kelly, W.K. and P.A. Marks, *Drug insight: Histone deacetylase inhibitors--development of the new targeted anticancer agent suberoylanilide hydroxamic acid*. Nat Clin Pract Oncol, 2005. **2**(3): p. 150-7.

63. Tao, R., E.F. de Zoeten, E. Ozkaynak, C. Chen, L. Wang, P.M. Porrett, B. Li, L.A. Turka, E.N. Olson, M.I. Greene, A.D. Wells, and W.W. Hancock, *Deacetylase inhibition promotes the generation and function of regulatory T cells*. Nat Med, 2007. **13**(11): p. 1299-307.
64. Majno, G. and I. Joris, *Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death*. Am J Pathol, 1995. **146**(1): p. 3-15.
65. Jacobs, D.B. and C. Pipho, *Use of propidium iodide staining and flow cytometry to measure anti-mediated cytotoxicity: resolution of complement-sensitive and resistant target cells*. J Immunol Methods, 1983. **62**(1): p. 101-8.
66. Chelly, J., J.C. Kaplan, P. Maire, S. Gautron, and A. Kahn, *Transcription of the dystrophin gene in human muscle and non-muscle tissue*. Nature, 1988. **333**(6176): p. 858-60.
67. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(9): p. 4350-4.
68. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. 1979. Biotechnology, 1992. **24**: p. 145-9.
69. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
70. Cheng, A., C.L. Johnson, and L.P. Ford, *A step-by-step procedure to analyze the efficacy of siRNA using real-time PCR*. Methods Mol Biol, 2008. **419**: p. 303-16.
71. Stroh, T., A. Batra, R. Glauben, I. Fedke, U. Erben, A. Kroesen, M.M. Heimesaat, S. Bereswill, S. Girardin, M. Zeitz, and B. Siegmund, *Nucleotide oligomerization domains 1 and 2: regulation of expression and function in preadipocytes*. J Immunol, 2008. **181**(5): p. 3620-7.
72. Stroh, T., U. Erben, A.A. Kuhl, M. Zeitz, and B. Siegmund, *Combined pulse electroporation--a novel strategy for highly efficient transfection of human and mouse cells*. PLoS One. **5**(3): p. e9488.
73. Todoerti, K., V. Barbui, O. Pedrini, M. Lionetti, G. Fossati, P. Mascagni, A. Rambaldi, A. Neri, M. Introna, L. Lombardi, and J. Golay, *Pleiotropic anti-myeloma activity of ITF2357: inhibition of interleukin-6 receptor signaling and repression of miR-19a and miR-19b*. Haematologica, 2010. **95**(2): p. 260-9.
74. Prince, H.M., M. Bishton, and S. Harrison, *The potential of histone deacetylase inhibitors for the treatment of multiple myeloma*. Leuk Lymphoma, 2008. **49**(3): p. 385-7.
75. Faraco, G., M. Pittelli, L. Cavone, S. Fossati, M. Porcu, P. Mascagni, G. Fossati, F. Moroni, and A. Chiarugi, *Histone deacetylase (HDAC) inhibitors reduce the glial inflammatory response in vitro and in vivo*. Neurobiol Dis, 2009. **36**(2): p. 269-79.
76. Reilly, C.M., N. Mishra, J.M. Miller, D. Joshi, P. Ruiz, V.M. Richon, P.A. Marks, and G.S. Gilkeson, *Modulation of renal disease in MRL/lpr mice by suberoylanilide hydroxamic acid*. J Immunol, 2004. **173**(6): p. 4171-8.
77. Mishra, N., C.M. Reilly, D.R. Brown, P. Ruiz, and G.S. Gilkeson, *Histone deacetylase inhibitors modulate renal disease in the MRL-lpr/lpr mouse*. J Clin Invest, 2003. **111**(4): p. 539-52.
78. Grabciec, A.M., S. Krausz, W. de Jager, T. Burakowski, D. Groot, M.E. Sanders, B.J. Prakken, W. Maslinski, E. Eldering, P.P. Tak, and K.A. Reedquist, *Histone deacetylase inhibitors suppress inflammatory activation of*

- rheumatoid arthritis patient synovial macrophages and tissue*. J Immunol. **184**(5): p. 2718-28.
79. Weiss, A., R. Shields, M. Newton, B. Manger, and J. Imboden, *Ligand-receptor interactions required for commitment to the activation of the interleukin 2 gene*. J Immunol, 1987. **138**(7): p. 2169-76.
80. Samelson, L.E., J.J. O'Shea, H. Luong, P. Ross, K.B. Urdahl, R.D. Klausner, and J. Bluestone, *T cell antigen receptor phosphorylation induced by an anti-receptor antibody*. J Immunol, 1987. **139**(8): p. 2708-14.
81. Croll, A.D., M.F. Wilkinson, and A.G. Morris, *Interleukin 2 receptor blockade by anti-Tac antibody inhibits IFN-gamma induction*. Cell Immunol, 1985. **92**(1): p. 184-9.
82. Levesque, M.C. and B.F. Haynes, *Activated T lymphocytes regulate hyaluronan binding to monocyte CD44 via production of IL-2 and IFN-gamma*. J Immunol, 2001. **166**(1): p. 188-96.
83. Jeurink, P.V., Y.M. Vissers, B. Rappard, and H.F. Savelkoul, *T cell responses in fresh and cryopreserved peripheral blood mononuclear cells: kinetics of cell viability, cellular subsets, proliferation, and cytokine production*. Cryobiology, 2008. **57**(2): p. 91-103.
84. Messi, M., I. Giacchetto, K. Nagata, A. Lanzavecchia, G. Natoli, and F. Sallusto, *Memory and flexibility of cytokine gene expression as separable properties of human T(H)1 and T(H)2 lymphocytes*. Nat Immunol, 2003. **4**(1): p. 78-86.
85. Glauben, R., E. Sonnenberg, M. Wetzel, P. Mascagni, and B. Siegmund, *Histone deacetylase inhibitors modulate interleukin 6-dependent CD4+ T cell polarization in vitro and in vivo*. J Biol Chem, 2014. **289**(9): p. 6142-51.
86. Aandahl, E.M., J. Michaelsson, W.J. Moretto, F.M. Hecht, and D.F. Nixon, *Human CD4+ CD25+ regulatory T cells control T-cell responses to human immunodeficiency virus and cytomegalovirus antigens*. J Virol, 2004. **78**(5): p. 2454-9.
87. Annunziato, F., L. Cosmi, V. Santarasci, L. Maggi, F. Liotta, B. Mazzinghi, E. Parente, L. Fili, S. Ferri, F. Frosali, F. Giudici, P. Romagnani, P. Parronchi, F. Tonelli, E. Maggi, and S. Romagnani, *Phenotypic and functional features of human Th17 cells*. J Exp Med, 2007. **204**(8): p. 1849-61.
88. Fujino, S., A. Andoh, S. Bamba, A. Ogawa, K. Hata, Y. Araki, T. Bamba, and Y. Fujiyama, *Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease*. Gut, 2003. **52**(1): p. 65-70.
89. Mitsiades, C.S., N.S. Mitsiades, C.J. McMullan, V. Poulaki, R. Shringarpure, T. Hideshima, M. Akiyama, D. Chauhan, N. Munshi, X. Gu, C. Bailey, M. Joseph, T.A. Libermann, V.M. Richon, P.A. Marks, and K.C. Anderson, *Transcriptional signature of histone deacetylase inhibition in multiple myeloma: biological and clinical implications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(2): p. 540-5.
90. Kim, J.M., H. Liu, M. Tazaki, M. Nagata, and F. Aoki, *Changes in histone acetylation during mouse oocyte meiosis*. J Cell Biol, 2003. **162**(1): p. 37-46.
91. Li, Y., G.D. Kao, B.A. Garcia, J. Shabanowitz, D.F. Hunt, J. Qin, C. Phelan, and M.A. Lazar, *A novel histone deacetylase pathway regulates mitosis by modulating Aurora B kinase activity*. Genes Dev, 2006. **20**(18): p. 2566-79.
92. Haberland, M., R.L. Montgomery, and E.N. Olson, *The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy*. Nat Rev Genet, 2009. **10**(1): p. 32-42.

93. Elbashir, S.M., J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, and T. Tuschl, *Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells*. *Nature*, 2001. **411**(6836): p. 494-8.
94. Elbashir, S.M., J. Harborth, K. Weber, and T. Tuschl, *Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs*. *Methods*, 2002. **26**(2): p. 199-213.
95. Ovcharenko, V.V., K. Pihlaja, and G. Stajer, *Stereospecific fragmentations in the mass spectra of stereoisomeric isoindoloquinazolines*. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2003. **14**(9): p. 1049-56.
96. Brunner, S., E. Furtbauer, T. Sauer, M. Kursa, and E. Wagner, *Overcoming the nuclear barrier: cell cycle independent nonviral gene transfer with linear polyethylenimine or electroporation*. *Mol Ther*, 2002. **5**(1): p. 80-6.
97. Furset, G. and M. Sioud, *Design of bifunctional siRNAs: combining immunostimulation and gene-silencing in one single siRNA molecule*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. **352**(3): p. 642-9.
98. Gabriel, B. and J. Teissie, *Direct observation in the millisecond time range of fluorescent molecule asymmetrical interaction with the electropermeabilized cell membrane*. *Biophys J*, 1997. **73**(5): p. 2630-7.
99. Stroh, T., U. Erben, A.A. Kuhl, M. Zeitz, and B. Siegmund, *Combined pulse electroporation--a novel strategy for highly efficient transfection of human and mouse cells*. *PLoS One*, 2010. **5**(3): p. e9488.
100. Pei, Y. and T. Tuschl, *On the art of identifying effective and specific siRNAs*. *Nat Methods*, 2006. **3**(9): p. 670-6.
101. Reynolds, A., D. Leake, Q. Boese, S. Scaringe, W.S. Marshall, and A. Khvorova, *Rational siRNA design for RNA interference*. *Nat Biotechnol*, 2004. **22**(3): p. 326-30.
102. Kawasaki, H., E. Suyama, M. Iyo, and K. Taira, *siRNAs generated by recombinant human Dicer induce specific and significant but target site-independent gene silencing in human cells*. *Nucleic Acids Res*, 2003. **31**(3): p. 981-7.
103. Mollinari, C., J.P. Kleman, Y. Saoudi, S.A. Jablonski, J. Perard, T.J. Yen, and R.L. Margolis, *Ablation of PRC1 by small interfering RNA demonstrates that cytokinetic abscission requires a central spindle bundle in mammalian cells, whereas completion of furrowing does not*. *Mol Biol Cell*, 2005. **16**(3): p. 1043-55.
104. Krueger, U., T. Bergauer, B. Kaufmann, I. Wolter, S. Pilk, M. Heider-Fabian, S. Kirch, C. Artz-Oppitz, M. Isselhorst, and J. Konrad, *Insights into effective RNAi gained from large-scale siRNA validation screening*. *Oligonucleotides*, 2007. **17**(2): p. 237-50.
105. Haberland, M., M.A. Arnold, J. McAnally, D. Phan, Y. Kim, and E.N. Olson, *Regulation of HDAC9 gene expression by MEF2 establishes a negative-feedback loop in the transcriptional circuitry of muscle differentiation*. *Mol Cell Biol*, 2007. **27**(2): p. 518-25.
106. Schmeck, B., J. Lorenz, D. N'Guessan P, B. Opitz, V. van Laak, J. Zahlten, H. Slevogt, M. Wizenrath, A. Flieger, N. Suttorp, and S. Hippenstiel, *Histone acetylation and flagellin are essential for Legionella pneumophila-induced cytokine expression*. *J Immunol*, 2008. **181**(2): p. 940-7.
107. de Zoeten, E.F., L. Wang, H. Sai, W.H. Dillmann, and W.W. Hancock, *Inhibition of HDAC9 increases T regulatory cell function and prevents colitis in mice*. *Gastroenterology*. **138**(2): p. 583-94.

108. Kasler, H.G. and E. Verdin, *Histone deacetylase 7 functions as a key regulator of genes involved in both positive and negative selection of thymocytes*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(14): p. 5184-200.
109. Li, B., A. Samanta, X. Song, K.T. Iacono, K. Bembas, R. Tao, S. Basu, J.L. Riley, W.W. Hancock, Y. Shen, S.J. Saouaf, and M.I. Greene, *FOXP3 interactions with histone acetyltransferase and class II histone deacetylases are required for repression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(11): p. 4571-6.

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Organisation der DNA.....	5
Abbildung 2: Nukleosom.....	6
Abbildung 3: Strukturformel ITF2357 (Givinostat®).....	10
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Differenzierung von naiven Th-Zellen .	12
Abbildung 5: Wirkmechanismus der RNA-Interferenz .....	15
Abbildung 6: Wirkung von ITF2357 auf CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen nach anti-CD3/-CD28-Stimulation.....	40
Abbildung 7: Wirkung auf CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen unter ConA-Stimulation.....	41
Abbildung 8: Wirkung des Histon-Deazetylase-Inhibitors ITF2357 auf Th1-Polarisierung im Antigen-spezifischen System .....	42
Abbildung 9: Wirkung von ITF2357 auf die Polarisierung von Th1-Zellen .....	43
Abbildung 10: Expression der IL6-R mRNA in naiven T-Zellen nach Inkubation mit ITF2357 .....	44
Abbildung 11: ChIP-Analyse des Histon H3 Azetylierungsstatus am IL-6R.....	44
Abbildung 12: Prozent Hemmung der mRNA von HDAC1 in CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen nach 24 und 48h.....	46
Abbildung 13: Western-Blot-Analyse zum Nachweis einer adäquaten Hemmung auf Proteinebene .....	46
Abbildung 14: Einfluss der Voltzahl auf die Transfektionseffizienz .....	47
Abbildung 15: Einfluss der Impulslänge auf die Transfektionseffizienz .....	48
Abbildung 16: Effizienzprüfung der eingesetzten siRNA.....	49
Abbildung 17: Verbesserung der Effizienz durch Einsatz mehrerer siRNA.....	50



## 9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der pharmakologischen HDACi-Klassen [17].....	8
Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Antikörper. Herkunft der Isotypen: Armenischer Hamster (Ar.H.), Hase (Rb), Maus (M), Ratte (R), Ziege (G).....	20
Tabelle 3: Übersicht der verwendeten siRNA-Sequenzen.....	31
Tabelle 4: Realtime-qPCR Primer .....	35
Tabelle 5: siRNA-Strategien für die HDAC5, 6 und 7. ....	50
Tabelle 6: Übersicht über die anti-inflammatorische Wirkung von HDAC-Inhibitoren in Tiermodellen.....	54

## 10 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Elena Sonnenberg, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Histon Deazetylase-spezifische Modifikation inflammatorischer Mediatoren

selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

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

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Betreuerin, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

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

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Elena Sonnenberg hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Glauben R, Sonnenberg E, Wetzel M, Mascagni P, Siegmund B.: Histone deacetylase inhibitors modulate interleukin 6-dependent CD4<sup>+</sup> T cell polarization in vitro and in vivo. J Biol Chem. 2014 Feb 28;289(9):6142-51

Beteiligung an:

Planung und Durchführung der Experimente sowie dem Verfassen der Publikation.

Unterschrift der Doktorandin

## **11 Lebenslauf**

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

## 12 Publikationsliste

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in Teilen in folgender Fachzeitschrift veröffentlicht

Glauben R, **Sonnenberg E**, Wetzel M, Mascagni P, Siegmund B.: Histone deacetylase inhibitors modulate interleukin 6-dependent CD4<sup>+</sup> T cell polarization in vitro and in vivo. J Biol Chem. 2014 Feb 28;289(9):6142-51

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind auf folgenden Kongressen vorgestellt und als Abstract veröffentlicht worden

The impact of HDAC inhibition on intestinal inflammation and its mechanistic background: **E. Sonnenberg**, R. Glauben, P. Mascagni, M. Zeitz, B. Siegmund. Falk Workshop – Mechanisms of Intestinal Inflammation, 10/2007 Dresden

The impact of HDAC inhibition on intestinal inflammation and its mechanistic background: **E. Sonnenberg**, Rainer Glauben, Inka Fedke, Thorsten Stroh, P. Mascagni, M. Zeitz, B. Siegmund. Joint Annual Meeting of Immunology of the Austrian and German Societies, Wien 2008

HDAC dependent regulation of the IL6/STAT3 pathway: **E. Sonnenberg**, R. Glauben, P. Mascagni, B. Siegmund. Deutscher Arbeitskreis chronisch entzündlicher Darmerkrankungen (DACHED) Juli 2011, Mainz

HDAC dependent regulation of the IL-6/STAT3 pathway during T helper cell activation: **E. Sonnenberg**, R. Glauben, P. Mascagni, B. Siegmund. Congress of the European Crohns' and Colitis Organization (ECCO), 14.02.-16.02.2016, Vienna Austria

HDAC-abhängige Regulation des IL-6/STAT3 pathway bei T-Helferzellaktivierung: **E. Sonnenberg**, R. Glauben, M. Wetzel, P. Mascagni, B. Siegmund. 68. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselerkrankungen (DGVS).11.-14.09.2013, NCC Nürnberg

### **13 Danksagung**

Zunächst mochte ich mich bei Frau Professor Dr. Siegmund für die Überlassung des Themas sowie die kontinuierliche konstruktive Begleitung während des experimentellen Teiles der Arbeit sowie des Schreibprozesses sehr herzlich bedanken.

Dr. Rainer Glauben möchte ich dafür danken, dass er seine Begeisterung für die T-Zellforschung mit mir geteilt und die Arbeit betreut hat.

Bei Inka Freise möchte ich mich für ihre professionelle immer geduldige Anleitung und Hilfe bei der Arbeit im Labor bedanken.

Mein größter Dank gilt meinem Mann und meiner Familie für ihre fortwährende Unterstützung in allen Phasen der Arbeit, ganz besonders möchte ich mich hier bei meiner Mutter und Schwiegermutter bedanken, ohne ihre unermüdliche Unterstützung bei der Betreuung unserer Kinder, Jonathan und Alma, würde diese Arbeit heute so nicht vorliegen.