

**Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik
(Department) Tübingen
Abteilung Innere Medizin II
(Schwerpunkt: Onkologie, Hämatologie, klinische Immunologie,
Rheumatologie)
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. L. Kanz**

**Regulierung der Funktion Dendritischer Zellen
durch Histon-Deacetylase-Inhibitoren**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Julia Beck
aus
Ludwigsburg
2009**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. P. Brossart

2. Berichterstatter: PD Dr. M. Bitzer

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
1.1 Histon-Deacetylase-Inhibitoren	1
1.2 Dendritische Zellen	3
1.3 Fragestellung	3
2 Material und Methoden	4
2.1 Geräte	4
2.2 Verbrauchsmaterialien	5
2.3 Reagenzien	6
2.4 Kits	8
2.5 Antikörper	8
2.6 Medien und Puffer	9
2.7 SDS-Gele	11
2.8 Zellen	11
2.9 Generierung dendritischer Zellen	12
2.9.1 Gewinnung von PBMNCs	12
2.9.2 Generierung dendritischer Zellen aus Monozyten	12
2.10 Bestimmung des Phänotyps	13
2.11 Messung der Apoptoserate	13
2.12 Messung der Migrationsrate	13
2.13 Messung der Kapazität zur Stimulation allogener Zellproliferation	14
2.14 Messung der Zytokinproduktion	14
2.15 Proteinbiochemische Methoden	15
2.15.1 Herstellung der Zelllysate und Bestimmung der Proteinkonzentration	15
2.15.2 Herstellung der Kernextrakte	15
2.15.3 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)	15

2.15.4	Western Blot	16
3	Ergebnisse	18
3.1	Phänotyp	18
3.2	Apoptoserate	21
3.3	Migration	22
3.4	Stimulierung allogener Zellproliferation	23
3.5	Zytokinproduktion	24
3.6	Transkriptionsfaktoren	25
4	Diskussion	30
4.1	Fragestellung	30
4.2	Methoden	31
4.3	Diskussion der Ergebnisse	32
4.4	Grenzen	35
4.5	Schlussfolgerung	36
5	Zusammenfassung	37
6	Literaturverzeichnis	38
7	Danksagung	43
8	Lebenslauf	44

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AML	Akute myeloische Leukämie
APC	Antigen präsentierende Zelle
BCA	<i>Bicinchoninic Acid</i>
BSA	Bovines Serum Albumin
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
DC	Dendritische Zelle
DC-SIGN	<i>DC-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent Assay</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor
HDAC	Histon-Deacetylase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
ICAM	<i>Intracellular Adhesion Molecule</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IRAK-1	IL-1-Rezeptor-assoziierte Kinase-1
IRF	Interferon-Regulationsfaktor
kD	Kilodalton
MIP-3 β	<i>Macrophage Inflammatory Protein-3β</i>
MLR	<i>Mixed Leukocyte Reaction</i>
NF- κ B	<i>Nuklear factor-κB</i>
PBMNC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes

PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Poly I:C	<i>Polyinosinic:polycytidylic acid</i>
SAHA	Suberoylanilidhydroxamidsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TLR	Toll-like-Rezeptor
Th1-Zelle	Inflammatorischer T-Lymphozyt
Th2-Zelle	T-Helfer-Zelle
TNF	Tumor-Nekrosefaktor
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
V	Volt
VPA	Valproinsäure

Abbildungsverzeichnis

3.1.A	Phänotyp	19
3.1.B	Konzentrationsabhängige Veränderung des Phänotyps	20
3.2	Apoptoserate	21
3.3	Migrationsrate	22
3.4	Kapazität zur Stimulation allogener Zellproliferation	23
3.6.A	Western Blots (PU.1, Bcl-6)	27
3.6.B	Western Blots (IRAK-1)	28
3.6.C	Western Blots (RelB, IRF-3, IRF-8)	29

Tabellenverzeichnis

2.1	Verwendete Geräte	4
2.2	Verwendete Verbrauchsmaterialien	5
2.3	Verwendete Reagenzien	6
2.4	Verwendete Kits	8
2.5	Verwendete Antikörper für FACS und Western Blot	8
2.6	Verwendete Puffer und Medien	9
2.7	Zusammensetzung der SDS-Gele	10
3.5	Zytokinproduktion	24

1 Einleitung

1.1 Histon-Deacetylase-Inhibitoren

Histon-Deacetylasen (HDACs) sind Enzyme, die in Zusammenarbeit mit ihrem Gegenspieler, den Histon-Acetyltransferasen, den Acetylierungsstatus der Histonproteine und anderer intrazellulärer Substrate regulieren^{1,2}. Acetylierung der Histone, sowie andere posttranskriptionale Modifikationen – zum Beispiel Methylierung, Phosphorylierung und Ubiquitinylierung – tragen zur Regulation der Chromatin-Architektur und Transkriptionsverfügbarkeit der DNA bei. Genauer gesagt führt die Acetylierung der Histone durch die Histon-Acetyltransferasen zu einer offenen Chromatinstruktur, wohingegen die Deacetylierung durch die HDACs eine eher kondensierte und passive Chromatinstruktur erzielt. Medikamente, welche die HDAC hemmen (HDAC-Inhibitoren) führen innerhalb von Stunden nach Behandlung zu einem Anstieg der Histon-Acetylierung und helfen so, die DNA in einen offeneren und transkriptionell aktiveren Zustand zu bringen^{1,2}.

Eine gesteigerte HDAC-Aktivität wird in einer Vielzahl der Krebszellen beobachtet, was zu Veränderungen der lokalen Chromatinstruktur, veränderter Gentranskription und beeinträchtigter Differenzierung führt. Tatsächlich besitzen alle verfügbaren HDAC-Inhibitoren einen gewissen Grad präklinischer Aktivität in Tumor-Zelllinien und in Tiermodellen verschiedener Krebserkrankungen^{1,2}. Bei akuten Leukämien üben HDAC-Hemmer ihre Anti-Tumor-Effekte über die Förderung der unterdrückten Transkription aus. Hierdurch wird der Differenzierungsstopp aufgehoben, der durch chimäre Onkogene wie PML-RAR α , PLZF-RAR α oder AML-ETO induziert wurde^{1,2}. Bei anderen malignen Erkrankungen scheinen andere Mechanismen eine Rolle zu spielen, einschließlich der Relokalisation von BAX in die Mitochondrien, vermehrten Expression von p21/WAF und anderen Tumorsuppressoren, sowie auf umgekehrtem Wege die HDAC-induzierte Unterdrückung von Tyrosinkinasen, wie BCR/Abl oder Her-2/neu. Zudem induzieren HDAC-Inhibitoren die

Hyperacetylierung von Promotoren und bewirken folglich eine gesteigerte Expression verschiedener Mitglieder der Todesrezeptor-Signalwege an der Zelloberfläche, einschließlich Fas, Fas-Ligand, TRAIL und TRAIL-Rezeptor DR5, wodurch auch die TRAIL-induzierte Apoptose der leukämischen Zellen gesteigert wird^{1,2}. Einige HDAC-Hemmer finden nun Anwendung in klinischen Studien zur Behandlung solider und hämatologischer Malignitäten und zeigen bisher vor allem in T-Zell-Lymphomen und bestimmten Subtypen der AML viel versprechende Ergebnisse¹⁻⁴.

Einige Studien konnten zeigen, dass HDAC-Inhibitoren außer ihrer Anti-Tumor-Eigenschaften auch antientzündliche Effekte besitzen. Wurden diese kleinen Moleküle an Mäuse verabreicht, konnte eine verminderte autoimmune Manifestation der Graft-versus-Host-Erkrankung, des systemischen Lupus erythematoses, der Concanavalin A-induzierten Hepatitis, der experimentellen Autoimmun-Enzephalitis, der rheumatoiden Arthritis sowie der Colitis festgestellt werden⁵⁻¹¹. Weiter wurde berichtet, dass die HDAC-Inhibitoren Suberoylanilidhydroxamidsäure (SAHA), Trichostatin A und Valproat sowohl *in vivo* bei Mäusen als auch *in vitro* die Sekretion proinflammatorischer Zytokine, wie *Tumor necrosis factor α* (TNF α), Interleukin (IL)-1 β , IL-6 und IL-12, blockierten^{5,6,10,11}. Wie genau die immunologischen Effekte der HDAC-Hemmer vermittelt werden, ist noch unklar. Bei T-Lymphozyten trägt die HDAC6-vermittelte Tubulin-Deacetylierung zur CD3- und LFA-1-Orientierung und zur Bildung der immunologischen Synapse bei¹². Wieder andere Studien ermittelten als bedeutendste Effekte der HDAC-Hemmung ihre Auswirkungen auf die proliferativen und zytotoxischen Reaktionen der T-Zelle und auf ihre IFN- γ -Produktion^{5,6,10}, wobei sie die Möglichkeit offen ließen, dass andere Zelltypen noch schwerwiegender durch HDAC-Inhibitoren beeinflusst werden und somit zu den immunmodulierenden Eigenschaften dieser Medikamente beitragen. In diesem Kontext zeigten neuere Experimente die Kapazität eines selektiven HDAC-Hemmers – LAQ824 –, spezifisch die Genexpression in Makrophagen und Dendritischen Zellen (DCs) zu modulieren, was zu einer verminderten Zytokinproduktion und der bevorzugten Stimulierung von Th2- im Vergleich zu Th1-Lymphozyten führte¹³.

1.2 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DCs) stellen eine Leukozytenpopulation mit antigenpräsentierender Funktion dar, die eine zentrale Rolle bei der Initiierung von Immunantworten spielt^{14,15}. Vom Knochenmark abstammende DC-Vorläufer, einschließlich zirkulierender Monozyten, siedeln sich im peripheren Gewebe ab und differenzieren dort aus – möglicherweise unter dem Einfluss lokal produzierter Zytokine und Prostaglandine. DCs werden durch die Anwesenheit von Pathogenen aktiviert, wenn die auf der Oberfläche exprimierten Toll-like-Rezeptoren (TLRs) durch das dem Pathogen zugehörige Produkt (zum Beispiel Lipopolysaccharide, Poly I:C, doppelsträngige RNA) stimuliert werden¹⁶. Nach Aktivierung wandern die DCs zum afferenten Lymphgewebe, um dort antigenspezifische T-Lymphozyten zu stimulieren. Angelockt werden die DCs hierbei vom Chemoattraktant *Chemokine (C-C motif) ligand 19 (CCL19/macrophage inflammatory protein-3 β (MIP-3 β))*¹⁴. Die Immunogenität der DCs wird für einen der Hauptfaktoren gehalten, die den Ausgang einer Immunantwort kontrollieren, und tatsächlich konnte gezeigt werden, dass die Deregulation von DC-Funktion und -Überleben zu autoimmunen Manifestationen im Mausmodell führte¹⁷.

1.3 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit sollten die Effekte verschiedener HDAC-Inhibitoren auf die Differenzierung und Funktion menschlicher, von Monozyten abstammender DCs evaluiert werden. Da verschiedene HDAC-Hemmer sich sehr unterschiedlich auf biologische Stoffwechselwege auswirken können, wurden zwei strukturell nicht verwandte Substrate, VPA und MS-275^{1,2} verwendet, um die Spezifität der Ergebnisse zu unterstreichen.

Die Experimente mit VPA wurden allein von mir durchgeführt. Im Folgenden werde ich mich somit auf diesen Inhibitor konzentrieren und erst in der Diskussion auf den zweiten Inhibitor MS-275 eingehen.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Tabelle 2.1: Verwendete Geräte.

Gerät	Hersteller
Bestrahlungsgerät Gammacell 1000	MDS Nordion, Bucks, Großbritannien
Durchflussszytometer FACSCalibur	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Gefrierschrank Forma Scientific -80°C	Stiel, Tübingen, Deutschland
Heizplatte für <i>Eppendorf-Cups</i> Unitek HBS-130	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Kühlschrank-Kombination 4°C und -20°C	Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
Magnetrührer RCT basic	IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Mini-Protean 3 Electrophoresis System	BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Minishaker MS1	IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Mini Trans Blot Cell	BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland
MLR-Counter 1205 Betaplate	LKB Wallace, Turku, Finnland
Neubauer Zählkammer 0,1 mm Tiefe	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland
Photometer SLT Spectra	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland
Pipette 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe Pipetboy acu	Integra Biosciences Europe, Freiburg, Deutschland
Sterilbank	Heraeus, Hanau, Deutschland

Wasserbad	Memmert, Schwabach, Deutschland
Zellkultur-Brutschrank NuAire™US-Auto-Flow	NuAire, Plymouth, USA
Zentrifuge Centrifuge 4515R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Heraeus Multifuge 3 S-R	Kendro, Fellbach, Deutschland

2.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.2: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Produkt	Hersteller
Combitips Plus 5ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
FACS-Röhrchen groß, klein	Becton Dickenson, Franklin Lakes, USA
Falcon® Blue Max™ 15 ml Blue Cups	Becton Dickenson, Franklin Lakes, USA
Falcon® Blue Max™ 50 ml Blue Cups	Becton Dickenson, Franklin Lakes, USA
Kodak BioMax Light Film	KODAK, Chalon-sur-Saône, Frankreich
Nitrozellulosemembran	Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland
NUNC Cryo Tube™ Vials 1 ml, 1,8 ml	Nunc A/S Apogent, Roskilde, Dänemark
Pasteurpipette	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pipettenspitzen Safeseal Tips Premium 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl	Biozym Scientific, Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitzen 1,0 ml blau, 0,2 ml gelb	Sarstedt, Nürmbrecht, Deutschland
Pipetten Stridette 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Corning GmbH, Kaiserslautern, Deutschland

Reaktionsgefäße <i>Eppendorf-Cups</i> 1,5ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Transwells	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Whatman-Papier	Whatman International Ltd., Maidstone, England
Zellkulturflaschen Falcon® Tissue Culture Flask 0,2µl Vented Blue Plug Seal Cup 275 ml	Becton Dickenson, Franklin Lakes, USA
Zellkulturplatte 24 well T-shape Cellstar®	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturplatte 96 well T-shape Cellstar® with lid	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturplatte 96 well V-shape Cellstar®	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

2.3 Reagenzien

Tabelle 2.3: Verwendete Reagenzien. Chemikalien, welche hier nicht aufgeführt sind, wurden von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Serva (Heidelberg, Deutschland) und Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) bezogen.

Produkt	Hersteller
Bench Mark™ Prestained Protein Ladder	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Biocoll Separating Solution (Ficoll)	BioChrom AG, Berlin, Deutschland
Bovine Serum Albumine (BSA)	Roche, Mannheim, Deutschland
ECL™ plus detection reagent	GE Healthcare Ltd., München, Deutschland
EDTA 0,5 M	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Fetal Bovine Serum 10082 (FCS)	Invitrogen Gibco™, Karlsruhe, Deutschland
GM-CSF Leukine® Liquid	Immunex Corporation, Seattle, USA
Sargramostim	
³ H-Thymidin	Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig, Deutschland
IL-4	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Medium RPMI 1640 mit Glutamax	Invitrogen Gibco™, Karlsruhe, Deutschland
Medium X-VIVO 20	Bio Whittaker, Wakersville, USA
MIP-3β	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
PBS: Dulbeccos Phosphate Buffered Saline 0,0095 M (PO4)	Invitrogen Gibco™, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin.Streptomycin 100ml	Invitrogen Gibco™, Karlsruhe, Deutschland
Poly I:C	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Slim Fast Schokolade	Slim Fast Deutschland GmbH, Wiesbaden, Deutschland
Trypanblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tween® 20	Merck, Darmstadt, Deutschland
VPA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

2.4 Kits

Tabelle 2.4: Verwendete Kits

Produkt	Hersteller
BCA Protein Assay Reagent Kit	Pierce, Perbio Science, Bonn, Deutschland
ELISA für IL-6, IL-10, IL-12, TNF α	Immunotech, Hamburg, Deutschland

2.5 Antikörper

Tabelle 2.5: Verwendete Antikörper für FACS und Western Blot.

Antikörper	Hersteller
Bcl-6 (C-19): sc-368	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Deutschland
CD1a FITC	Dako Diagnostik, Hamburg, Deutschland
CD40 FITC	Becton Dickenson, Franklin Lakes, USA
CD54 PE	Becton Dickenson, Franklin Lakes, USA
CD80 PE	Becton Dickenson, Franklin Lakes, USA
CD83 PE	Immunotech, Marseille, Frankreich
CD86 FITC	Becton Dickenson, Franklin Lakes, USA
DC-Sign PE	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
GAPDH	HyTest, Turku, Finnland
IRAK-1 (F-4): sc-5288	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Deutschland

IRF-3 (C-20): sc-15991	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Deutschland
IRF-8 (C-19): sc-6058	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Deutschland
Mouse IgG FITC, PE	Becton Dickenson, Franklin Lakes, USA
PU.1 (H-135): sc-22805	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Deutschland
RelB (C-19): sc-226	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Deutschland
Sekundärantikörper <i>Donkey-anti-Goat</i> IgG	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Deutschland
Sekundärantikörper <i>Goat-anti-Mouse</i> IgG	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Deutschland
Sekundärantikörper <i>Goat-anti-Rabbit</i> IgG	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Deutschland

2.6 Medien und Puffer

Tabelle 2.6: Verwendete Medien und Puffer.

Puffer/Medium	Zusammensetzung
FACS-Puffer	PBS 5% BSA
Laufpuffer (Runningbuffer) für Western Blot 1-fach	192 mM Glycin 25 mM Tris 0,1% SDS
NP-40	10% Igepal CA-630
Puffer A	1 mM DTT 0,5 mM PMSF

Puffer C	1 mM DTT
	1 mM PMSF
RIPA-Lysepuffer	PBS
	1% Igepal CA-630
	0,5% Natriumdeoxycholat
	0,1% SDS
	2 mM EDTA
	2 mg/ml Aprotinin
	1 mM PMSF
	1 mM Natriumorthovanadat
RPMI-Medium	RPMI 1640 mit Glutamax ergänzt mit
	10% hitzeinaktiviertem FCS, Penicillin
	100 IU/ml und Streptomycin 100
	mg/ml
Slimfastlösung 2,5%	2,5% Slimfast Schokolade
	gelöst in 1x TBS/0,5% Tween
Slimfastlösung 4%	4% Slimfast Schokolade
	gelöst in 1x TBS/0,5% Tween
TBS 1-fach	0,14 M NaCl
	0,01 M Tris/HCl pH 8,0
TBS-Tween	1-fach TBS
	0,5% Tween
Transferpuffer für Western Blot	192 mM Glycin
	25 mM Tris
	20% Methanol
	0,1% SDS

2.7 SDS-Gele

Tabelle 2.7: Zusammensetzung der SDS-Gele.

Reagenzien	Trenngel 10%	Trenngel 12%	Sammelgel
1 M Tris pH 8,8	5,6 ml	5,6 ml	-
1 M Tris pH 6,7	-	-	1 ml
Acrylamid 30%	5 ml	6 ml	1 ml
SDS 10%	150 μ l	150 μ l	50 μ l
dest. Wasser	4,2 ml	3,2 ml	3 ml
APS 10%	100 μ l	100 μ l	50 μ l
TEMED	10 μ l	10 μ l	5 μ l

2.8 Zellen

Alle verwendeten Zellen wurden aus Buffy coats oder Leukapherisaten extrahiert, welche von freiwilligen Spendern der Blutbank Tübingen stammen.

2.9 Generierung dendritischer Zellen

2.9.1 Gewinnung von PBMCs

Die dendritischen Zellen wurden, wie vormals beschrieben¹⁸⁻²², aus adhärenenten Monozyten generiert. Aus Buffy coats und Leukapherisaten von freiwilligen Spendern wurden mononukleäre Zellen durch Ficoll-Dichtegradient-Zentrifugation isoliert. Die Zellen wurden in vorgewärmtem RPMI-Medium resuspendiert und mittels Trypanblaufärbung die Lebendzellzahl bestimmt. Anschließend wurden bis zu 1×10^8 Zellen in 10 ml vorgewärmtem, serumfreiem X-Vivo 20-Medium pro Kulturflasche (275 cm²) ausgesät und für zwei Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach dieser Adhärenzzeit wurden die nicht adhärenenten Zellen durch mehrmaliges Waschen mit PBS entfernt.

2.9.2 Generierung dendritischer Zellen aus Monozyten

Die so präparierten Monozyten wurden jeden zweiten Tag, beginnend mit Tag 0, mit jeweils 20 µl IL-4 und GM-CSF gefüttert. Des Weiteren wurde an denselben Tagen die jeweilige Konzentration Valproat (VPA; 0, 10, 20, 40, 100 µg/ml) hinzugegeben. An Tag 6 wurde eine Hälfte der Ansätze mit 50 µl Poly I:C, einem TLR-Liganden, versetzt, um reife dendritische Zellen zu erhalten. An Tag 7 wurden alle Zellen durch Waschen mit 10 ml PBS + 5 mM EDTA geerntet und die jeweilige Zellzahl mittels Trypanblaufärbung bestimmt. Die Hemmung der HDAC wurde durch Überwachung der acetylierten H3-Histon-Level mittels Immunoblotting festgestellt.

2.10 Bestimmung des Phänotyps

Zur Bestimmung des Phänotyps wurden die DCs mit FITC- oder Phycoerythrin-konjugierten, monoklonalen Maus-Antikörpern gegen CD1a, CD40, CD54, CD80, CD83, CD86 und DCSIGN, sowie gegen die Maus-IgG-Isotypkontrolle gefärbt.

Hierfür wurden die unspezifischen Antikörperbindungen der DCs zuerst mit je 5 µl unmarkiertem Maus-IgG geblockt und dann mit dem gewünschten Antikörper für 5-10 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die in FACS-Puffer resuspendierten Zellen konnten anschließend mit Hilfe des Durchflusszytometers FACSCalibur bezüglich ihres Phänotyps analysiert werden. Hierbei wurden innerhalb der Negativkontrolle 1% falsch-positiver Ereignisse akzeptiert.

2.11 Messung der Apoptoserate

Zur Bestimmung der Apoptoserate wurden die Zellen mit Propidiumiodid gefärbt. Propidiumiodid kann nur durch eine beschädigte Zellmembran in die Zelle eindringen, wie man sie bei apoptotischen Zellen findet. Diese Propidiumiodid-positiven Zellen wurden mit Hilfe des Durchflusszytometers FACSCalibur quantifiziert.

2.12 Messung der Migrationsrate

Zur Bestimmung der Migrationsrate wurden je zwei Wells einer 24well-Platte pro Ansatz mit 1 ml RPMI-Medium befüllt und eine Hälfte der Wells zusätzlich mit je 100 ng/ml MIP-3β versetzt. Anschließend wurden in alle Wells Transwells eingesetzt und in diese wiederum 10^6 Zellen in 1 ml RPMI-Medium ausgesät. Für jeden Ansatz wurde also ein Well ohne und eines mit MIP-3β befüllt. Während der dreistündigen Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ sollten

migrationsfähige DCs durch die Poren der Transwells in Richtung des Wellbodens wandern. MIP-3 β ist ein Chemoattraktant, welches diesen Vorgang fördert. Anschließend wurden alle Transwells entfernt und die Zahl der migrierten Zellen im Durchflusszytometer FACSCalibur über 60 Sekunden ausgezählt.

2.13 Messung der Kapazität zur Stimulation allogener Zellproliferation

Zur Bestimmung der Kapazität der DCs zur Stimulation allogener Zellproliferation wurden 10^5 reagierende Zellen aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMNCs) zusammen mit 10^4 stimulierenden DCs in 96well-Platten kokultiviert. Die DCs wurden zuvor mit 30 Gy bestrahlt, um deren Stoffwechselaktivität zu hemmen, die Antigenpräsentation kann danach trotzdem weiter ausgeübt werden. So können nur die allogenen PBMNCs proliferieren, nicht die DCs. An Tag 5 wurde ^3H -Thymidin hinzugegeben. ^3H -Thymidin wird bei proliferierenden Zellen ins Genom eingebaut. Nach 16 Stunden wurden die Zellen geerntet und die Thymidin-Aufnahme mit Hilfe eines MLR-Readers gemessen.

2.14 Messung der Zytokinproduktion

Zur Quantifizierung der Zytokinproduktion wurden vom jeweiligen Kulturmedium der DCs Überstände abgenommen und bei -20°C eingefroren. Die Zytokinkonzentrationen wurden in kommerziell erhältlichen Zweiseiten-Sandwich-ELISAs für IL-6, IL-10, IL-12 und TNF α entsprechend der Herstellerhinweise bestimmt.

2.15 Proteinbiochemische Methoden

2.15.1 Herstellung der Zelllysate und Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Präparation der Zelllysate wurden die DCs im Lysepuffer RIPA für mindestens 20 Minuten auf Eis lysiert und bei -80°C aufbewahrt.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden je 5 µl Lysat im Verhältnis 1:5 mit RIPA-Lysepuffer verdünnt und anschließend mit Hilfe eines BCA-Versuchs quantifiziert. Hierbei wird die Extinktion der jeweiligen Probe mit der einer Standardkurve verglichen und so auf den Proteingehalt rückgeschlossen.

2.15.2 Herstellung der Kernextrakte

Die Kernextrakte wurden wie bereits beschrieben²² hergestellt. Zuerst wurde mit dem Puffer A und NP-40 die Zellmembran der DCs auf Eis lysiert und abzentrifugiert. Anschließend wurde das nukleäre Pellet im Puffer C ebenfalls auf Eis lysiert und die Kernextrakte bei -70°C aufbewahrt.

2.15.3 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Bei der Gelelektrophorese mit einem SDS-Gel werden Proteine entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Hierfür wurde zuerst ein 10%iges bzw. 12%iges Trenngel gegossen und mit Isopropanol während der Polymerisation bedeckt. Anschließend wurde das Isopropanol mit destilliertem Wasser entfernt, das Sammelgel aufgegossen und ein 10-Taschen-Kamm zur Bildung der Taschen eingelegt. Das Sammelgel dient zur Fokussierung der Proben, sodass deutlichere Banden entstehen.

Die fertigen Gele wurden in die Elektrophoresekammer eingespannt und diese mit Laufpuffer aufgefüllt. Nach Ziehen des Kammes wurden die Taschen mit Laufpuffer ausgespült und mit Protein beladen.

Pro Ansatz wurden 20 µg Protein mit 3x SB/30% 1M DTT auf ein Endvolumen von 20 µl verdünnt, aufgeköcht und damit je eine Tasche befüllt. Tasche 1 wurde zusätzlich mit 6 µl des Markers „Prestained“ beladen. Dieser erzeugt blaue Banden bei 181,1 kD, 115,5 kD, 82,2 kD, 48,8 kD, 37,1 kD, 25,9 kD, 19,4 kD, 14,8 kD und 6,0 kD und eine rosa Bande bei 64,2 kD und ist schon während des Elektrophoresevorgangs sichtbar, sodass die Auftrennung individuell rechtzeitig gestoppt werden kann. Die Elektrophorese erfolgte bei 110-120V.

2.15.4 Western Blot

Beim Western Blot werden die in der Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine mittels eines elektrischen Feldes auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Dort können diese dann durch verschiedene Antikörper sichtbar gemacht werden.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele in folgender Reihenfolge in eine Blottingapparatur eingespannt: Kathode – Schwamm – Whatman-Papier – Gel – Nitrozellulosemembran – Whatman-Papier – Schwamm – Anode. Hierbei war darauf zu achten, dass alle Bestandteile durchgehend mit Transferpuffer getränkt sind und möglichst keine Luftblasen innerhalb des Sandwiches verbleiben. Der Blotting-Vorgang erfolgte anschließend in einer mit Transferpuffer gefüllten Kammer bei konstanten 250mA für eine Stunde, wobei auf ständige Kühlung zu achten war.

Nach Beendigung des Vorganges wurden die blauen und rosa Banden mit Bleistift auf der Nitrozellulosemembran markiert. Diese wurde dann für eine Stunde in einer 4%igen Slimfast-Lösung geblockt.

Die im Folgenden beschriebenen Schritte wurden zum Nachweis jedes einzelnen Proteins wiederholt. Zuerst wurde die Nitrozellulosemembran über

Nacht mit einem Primärantikörper in 2,5%iger Slimfast-Lösung inkubiert, welcher direkt an das gewünschte Protein bindet. Nach mehrmaligem Waschen mit 1x TBS/0,5% Tween, um überschüssigen Antikörper zu entfernen, wurde die Nitrozellulosemembran für eine Stunde mit einem passenden Sekundärantikörper in 2,5%iger Slimfast-Lösung inkubiert, welcher an den Primärantikörper bindet. An diese Sekundärantikörper ist die Meerrettichperoxidase gekoppelt, welche beim Zusatz von ECL1 und ECL2 ein Substrat bildet und dieses zu Licht umsetzt. Die so präparierten Membranen wurden zur Vermeidung von Austrocknen und zur einfacheren Handhabung in Frischhaltefolie eingeschlagen und die Lichtsignale der Sekundärantikörper anschließend mit Hilfe von lichtempfindlichen Filmen detektiert.

Bei den Zelllysaten wurden Antikörper gegen PU.1, Bcl-6, IRAK-1 und GAPDH (Ladekontrolle) verwendet, bei den Kernextrakten fanden Antikörper gegen RelB, IRF-3 und IRF-8 Anwendung.

3 Ergebnisse

3.1 Phänotyp

Zuerst sollte evaluiert werden, in wiefern eine Hemmung der Histon-Deacetylase die In-vitro-Differenzierung von Monozyten zu dendritischen Zellen im Beisein von IL-4 und GM-CSF beeinträchtigt. Daher wurde das Kulturmedium während der Differenzierung mit dem synthetischen HDAC-Inhibitor Valproat^{1,2} versetzt. Die verwendeten Konzentrationen wurden entsprechend des therapeutischen Bereichs ausgewählt, welcher für Valproat zwischen 50 und 100 µg/ml liegt²³.

Nach Valproat-Behandlung nahmen die DCs einen abnormen Phänotyp an, der sich durch die Abwesenheit des DC- und Langerhans Zell-Markers CD1a auszeichnete. Außerdem führte die HDAC-Hemmung zu einer verminderten Expression des kostimulatorischen Moleküls CD80 und des Aktivierungsmarkers CD83¹⁴, wohingegen die Expression eines weiteren kostimulatorischen Moleküls, CD 86, weniger herabgesetzt war. CD80 und CD86 initiieren das Sekundärsignal, welches für die Lymphozytenaktivierung zu Beginn der Immunantwort wichtig ist. Des Weiteren beeinträchtigte die Behandlung mit Valproat auch die Expression der Adhäsionsmoleküle CD54 und DC-SIGN (*dendritic cell-specific ICAM3-grabbing nonintegrin*), welche bei der DC-Lymphozyten-Interaktion beteiligt sind.

Im weiteren Verlauf untersuchte ich die Wirkung der HDAC-Hemmung auf die Reifung der DCs bei Zugabe des TLR-3-Liganden Poly I:C. Nicht mit Valproat behandelte Zellen zeigten einen normalen Anstieg der Expression der kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80, CD86 und CD83. Nach Behandlung mit Valproat war die vermehrte Expression von CD40, CD80 und CD83 deutlich, die gesteigerte Expression von CD83 in geringerem Maße reduziert. Die Expression von DC-SIGN war bei DCs, die mit Valproat generiert wurden, vermindert, wohingegen die Expression von CD54 etwa gleich der Kontrolle war. Alle diese Effekte zeigten eine Abhängigkeit von der verwendeten Konzentration des HDAC-Hemmers.

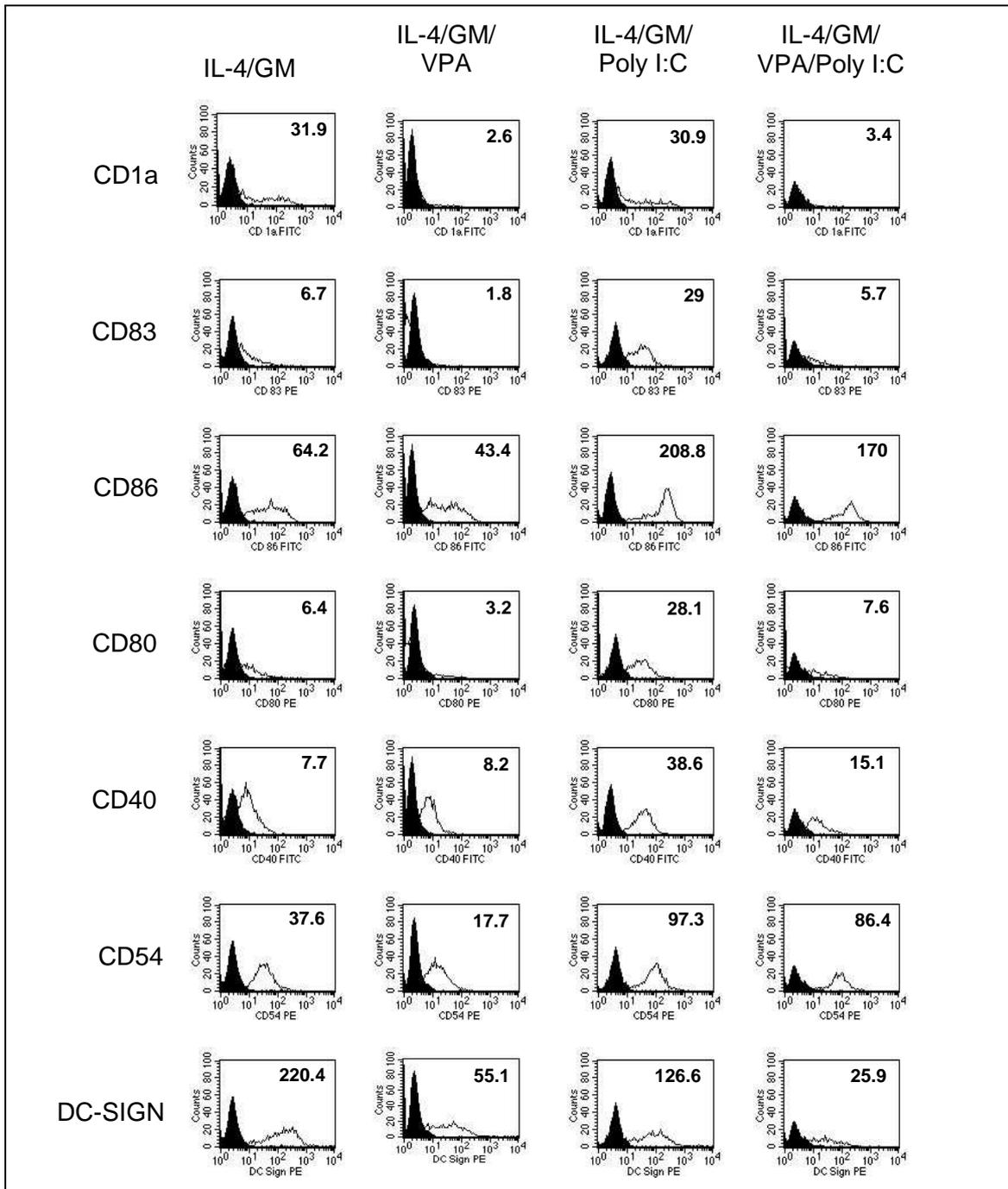


Abb. 3.1.A: Veränderung des Phänotypes bei dendritischen Zellen nach Behandlung mit Valproat (VPA). Adhärenente Monozyten wurden im Beisein von GM-CSF (GM) und IL-4, sowie mit oder ohne 100 µg/ml VPA sechs Tage lang kultiviert. An Tag 6 wurden die Zellen mit 50 µg/ml Poly I:C stimuliert oder unstimuliert belassen. Die Zellen wurden an Tag 7 geerntet, gewaschen, markiert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Grafiken zeigen den Histogrammplot (ungefüllte Kurve) im Vergleich zur passenden Isotypkontrolle (schwarz gefüllte Kurve). Die mittlere Fluoreszenz des entsprechenden Oberflächenmarkers ist innerhalb des Plots eingetragen.

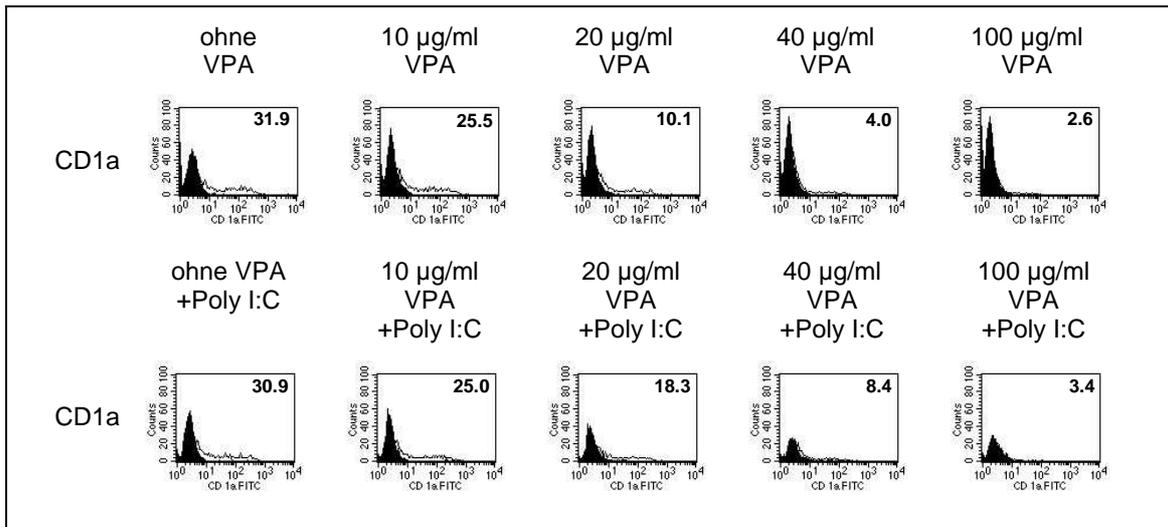


Abb. 3.1.B: VPA moduliert die Expression der Oberflächenmarker in Abhängigkeit zur verwendeten Konzentration. Adhärenzte Monozyten wurden wie in A beschrieben zur Differenzierung angeregt, jedoch zusätzlich mit den verschiedenen, hier aufgeführten Konzentrationen VPA gefüttert. Die Expression von CD1a wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

3.2 Apoptoserate

Um auszuschließen, dass die gemessenen Effekte der HDAC-Hemmung auf Apoptose beruhen, wurde die Apoptoserate über eine PI-Färbung nach Nicoletti bestimmt. Hier zeigte sich, dass keine der verwendeten Konzentrationen zu einer signifikanten Abnahme der Zellviabilität führte. Man kann daher davon ausgehen, dass die Behandlung mit Valproat sich hauptsächlich auf die Funktion der DCs auswirkte.

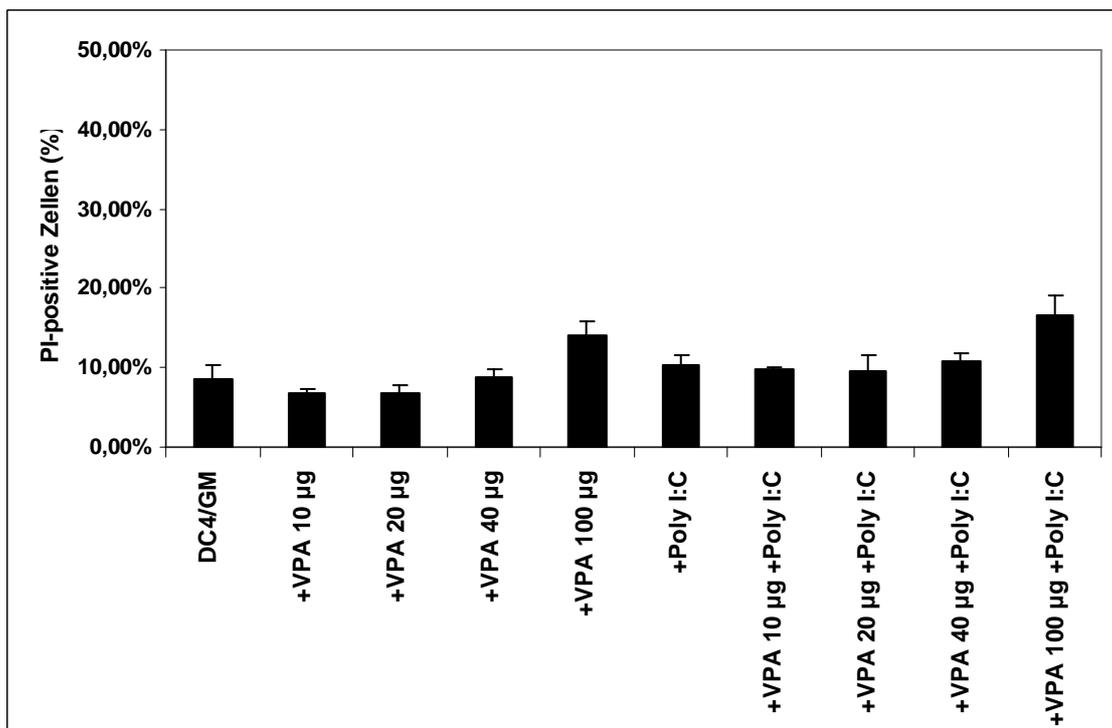


Abb. 3.2: Viabilität der VPA-exponierten DCs. Adhärenzte Monozyten wurden im Beisein von GM-CSF und IL-4 (DC4/GM) kultiviert und VPA in den angegebenen Konzentrationen (0-100 µg/ml) zugegeben. An Tag 6 wurden 50 µg/ml Poly I:C hinzugegeben, wo es im Diagramm eingetragen ist. Die Zellen wurden an Tag 7 geerntet, gewaschen und mit 5 µg/ml Propidiumiodid (PI) markiert und PI-positive (tote) Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie gezählt.

3.3 Migration

Reife DCs zeichnen sich unter anderem durch ihre Fähigkeit zur Migration aus. Angelockt werden sie durch das Chemoattraktant CCL19/MIP-3 β , wobei auf der DC-Oberfläche CCR7 (*cognate receptor chemokine (CC-motif) receptor 7*) hochreguliert wird¹⁴. Auf diese Weise können die dendritischen Zellen in den Lymphknoten gelangen.

Bei der Untersuchung der Migrationsrate mittels Transwell-Kammer fiel auf, dass bei steigenden Konzentrationen von Valproat diese Fähigkeit der reifen DCs deutlich reduziert war.

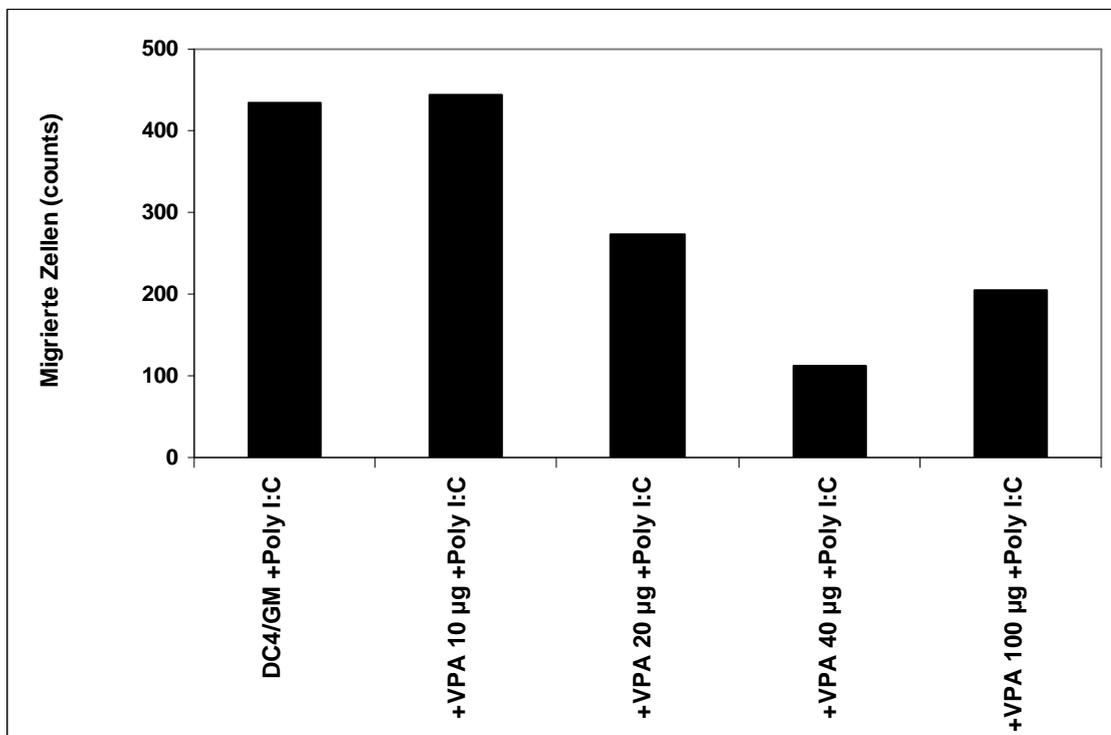


Abb. 3.3: VPA verhindert die Migration in Richtung CCL19/macrophage inflammatory protein-3 β (MIP-3 β). Adhärenente Monozyten wurden sieben Tage lang in GM-CSF- und IL-4-haltigem Medium kultiviert (DC4/GM). Poly I:C (50 μ g/ml) wurde an Tag 6 hinzugegeben. Die Zellen wurden an Tag 7 geerntet und die Migration wurde mit Hilfe von Transwell-Kammern analysiert. 10^5 DCs wurden in die obere Kammer ausgesät und die Zahl der migrierten Zellen nach drei Stunden analysiert.

3.4 Stimulierung allogener Zellproliferation

Eine weitere wichtige Funktion der reifen DCs ist ihre Fähigkeit, andere Zellen zur Proliferation anzuregen. In *mixed leukocyte reactions* (MLRs) werden DCs mit allogenen Lymphozyten kokultiviert und anschließend die Proliferation dieser Lymphozyten gemessen. Nach Behandlung mit Valproat war diese Fähigkeit sowohl bei unreifen als auch bei reifen DCs deutlich beeinträchtigt.

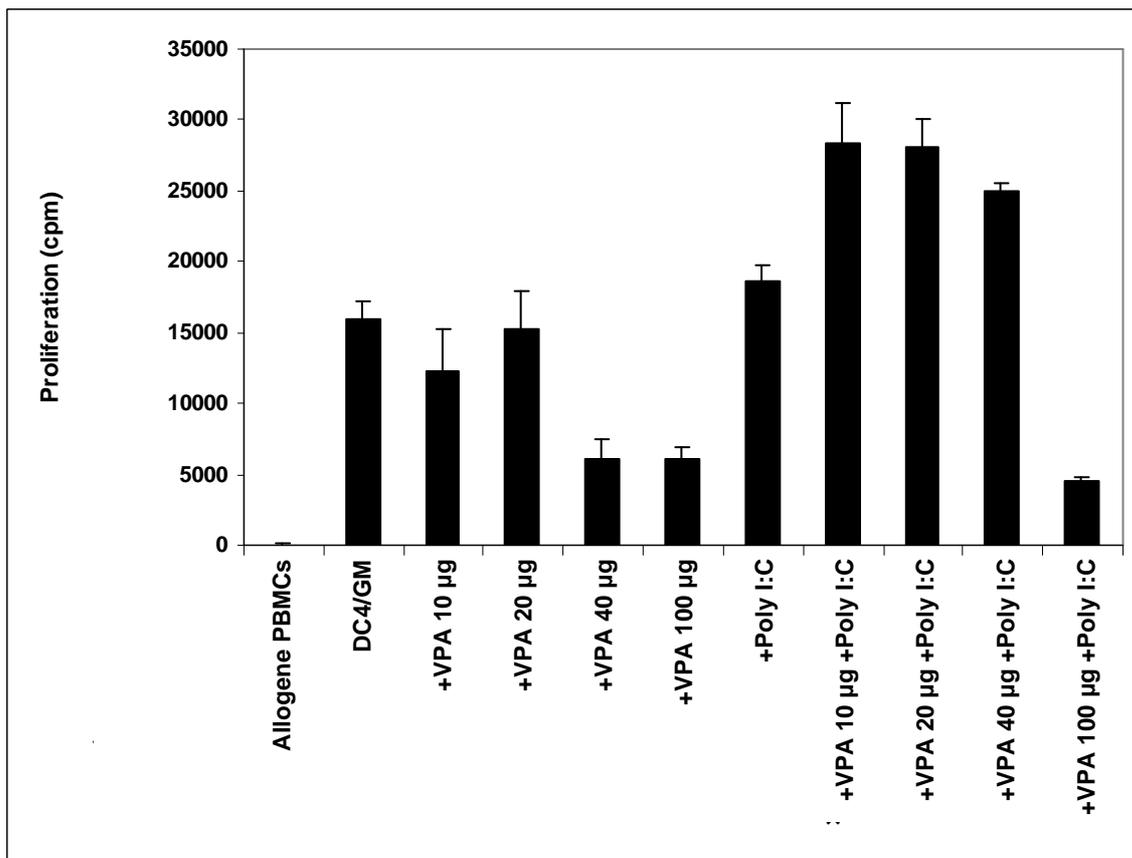


Abb. 3.4: Einfluss von VPA auf die immunostimulatorische Kapazität der DCs. Adhärente Monozyten wurden sechs Tage lang in GM-CSF- und IL-4-haltigem Medium kultiviert (DC4/GM), mit den angegebenen Konzentrationen VPA versetzt und die Hälfte der Ansätze an Tag 6 mit 50 µg/ml Poly I:C stimuliert. Die Zellen wurden an Tag 7 geerntet und als Stimulatoren in der gemischten Leukozytenreaktion (MLR) verwendet. Unbehandelte allogene mononukleäre Zellen des peripheren Blutes wurden als Kontrolle verwendet. Die Proliferation wurde nach 5 Tagen über die Thymidin-Aufnahme bestimmt.

3.5 Zytokinproduktion

Um mit anderen Zellen in Kontakt zu treten, bedienen sich dendritische Zellen unter anderem der Zytokine. Dies spiegelt sich zum Beispiel in einer Steigerung der Zytokinproduktion bei reifen DCs wider. Daher wurden in ELISAs die Menge an TNF α , IL-6, IL-10 und IL-12 im Überstand untersucht. Nach Hemmung der HDAC war die Produktion aller untersuchten Zytokine deutlich reduziert.

Diese Beobachtung stimmt mit denen anderer Forscher überein, die bereits über eine verminderte Zytokinproduktion bei PBMNCs der Maus und des Menschen nach Behandlung mit HDAC-Hemmern berichtet hatten^{5,6,10,11}.

Diese verminderte Zytokinproduktion könnte auch die reduzierte Fähigkeit zur Stimulierung allogener Lymphozytenproliferation erklären.

Tab. 3.5: Einfluss von VPA auf die Zytokinproduktion der DCs.

	DC4/GM	+Poly I:C	+VPA 10 μ g +Poly I:C	+VPA 20 μ g +Poly I:C	+VPA 40 μ g +Poly I:C	+VPA 100 μ g +Poly I:C
TNF α (pg/ml)	11,574	6245,79	3724,75	4888,9	4798,2	1150,82
IL-6 (pg/ml)	14,52	>10000	>10000	9230,81	6586,31	3671,37
IL-10 (pg/ml)	15	1742	118	80	17	3
IL-12 (pg/ml)	0,5	293,5	5,1	6	1	0,4

3.6 Transkriptionsfaktoren

Zum Schluss untersuchte ich die Auswirkungen der HDAC-Hemmung auf die intrazellulären Signaltransduktionswege, die eine Schlüsselrolle bei der Kontrolle der Differenzierung und Funktion der dendritischen Zellen spielen.

Es ist berichtet worden, dass die Hemmung der HDAC zu einer verminderten Expression des hämatopoietischen Transkriptionsfaktors PU.1 führt, welcher zur Entwicklung der dendritischen Langerhans-Zellen in Thymus und Knochenmark der Maus beiträgt²⁵⁻²⁷. Wir untersuchten daher, inwiefern die Expression von PU.1 in mit Valproat behandelten menschlichen DCs beeinträchtigt ist, konnten jedoch keine signifikante Reduktion der Proteinmenge feststellen. Dies deutet darauf hin, dass eine Verkürzung des PU.1-Proteins für die beobachteten funktionellen Defekte der DCs nach Valproat-Behandlung verantwortlich sein könnte.

Auch auf die Expression von Bcl-6, ein weiteres Target der HDAC-Hemmer, hatte die Behandlung mit Valproat keinen signifikanten Einfluss. Bcl-6 spielt sowohl bei Lymphomen als auch bei der Regulation der Zytokin- und Chemokinausschüttung in Makrophagen eine wichtige Rolle²⁸⁻³⁰.

In weiteren Experimenten wurde die Auswirkung der HDAC-Hemmung auf die Aktivierung der DCs untersucht. Diese kann über die Menge der in den Kern translozierten *nuclear factor-κB* (NF-κB)-Untereinheit RelB, sowie die Menge an IRF-3 und IRF-8 im Kern gemessen werden. Über die NF-κB-Untereinheit RelA ist bekannt, dass sie durch Acetylierung reguliert wird und HDAC-Hemmer ihre Translokalisierung in den Kern und somit auch ihre Transkriptionsaktivität fördern^{31,32}. Im Gegensatz dazu gibt es noch keine Informationen über den Effekt der HDAC-Hemmung auf RelB und c-Rel, obwohl vor allem RelB für seine Bedeutung bei Generierung und Funktion der DCs bekannt ist³³⁻³⁶. Ebenso existieren Hinweise darauf, dass HDAC-Hemmer möglicherweise die Aktivierung des Interferon-Stoffwechselweges und die IFNβ-Sekretion verhindern. Jedoch konnte dies bisher nur bei Osteoklasten gezeigt werden^{37,38}. Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass die Behandlung der DCs mit Valproat in einer reduzierten nukleären Expression von RelB resultiert. Des

Weiteren war die Relokalisation in den Kern bei mittels Poly I:C ausgereiften DCs in Abhängigkeit der Konzentration des verwendeten HDAC-Inhibitors blockiert. Andererseits war die Hochregulation von IRAK-1 (*IL-1 receptor-associated kinase-1*) als Antwort auf die Stimulation mit Poly I:C von der Behandlung mit Valproat nicht beeinträchtigt. Dies deutet darauf hin, dass der beobachtete Effekt auf RelB wahrscheinlich *downstream* von MyD88 und IRAK-1 induziert wird³⁹.

Als weiterer Effekt auf die Transkriptionsfaktoren zeigten auch IRF-3 und IRF-8, welche bei der Differenzierung, IL-12-Produktion und Migration der dendritischen Zellen mitwirken⁴⁰⁻⁴², eine verminderte nukleäre Expression nach Behandlung mit Valproat. Dieser Effekt war am deutlichsten bei DCs, die mit Poly I:C aktiviert wurden, zu sehen.

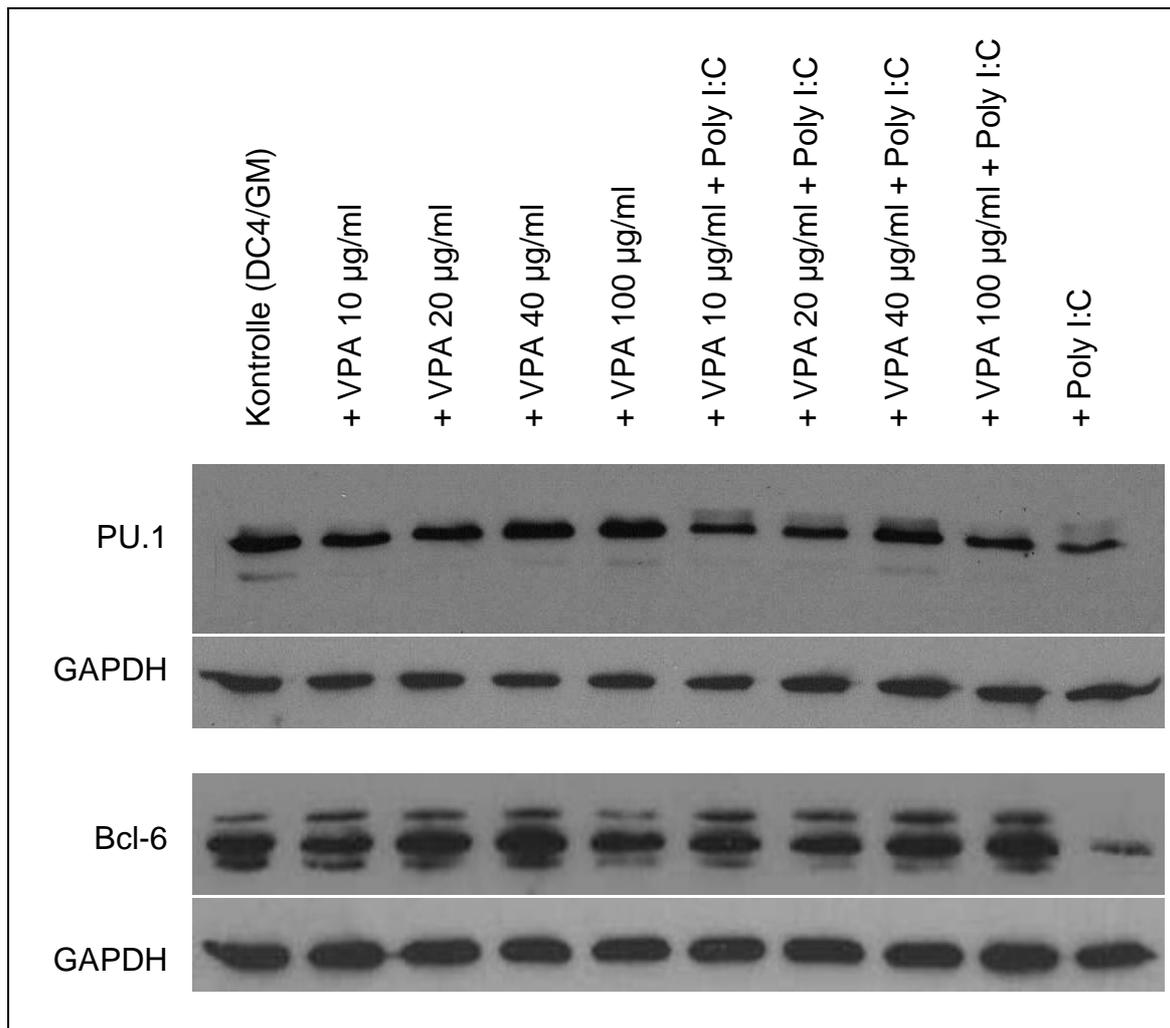


Abb. 3.6.A: VPA verändert weder die PU.1- noch die Bcl-6-Level bei DCs. Adhärente Monozyten des peripheren Blutes wurden sieben Tage lang mit GM-CSF und IL-4 kultiviert (DC4/GM) und ohne oder mit VPA in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und zur Herstellung von Zelllysaten verwendet. Die PU.1-, Bcl-6- und GAPDH-Level wurden mittels Western Blot sichtbar gemacht.

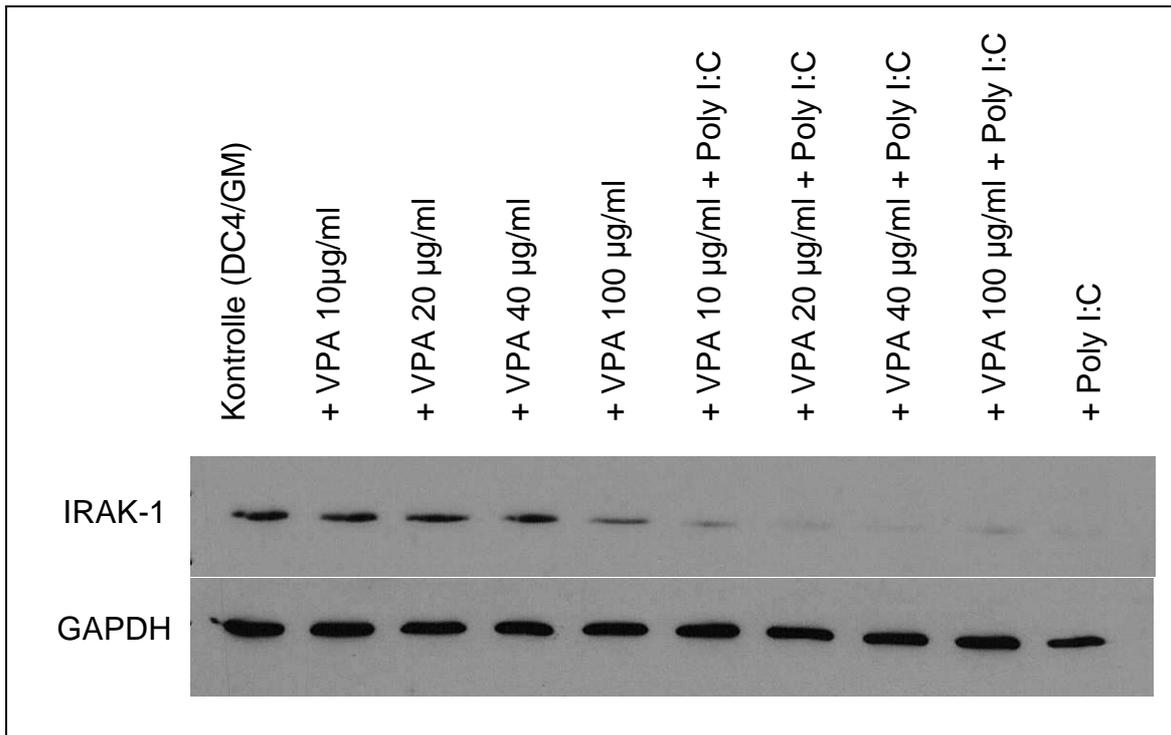


Abb. 3.6.B: VPA beeinträchtigt nicht die Poly I:C-induzierte verminderte Expression von IRAK-1 in reifen DCs. Adhärente Monozyten wurden wie in A beschrieben behandelt und an Tag 6 mit 50 µg/ml Poly I:C stimuliert, wo es in der Abbildung eingetragen ist. An Tag 7 wurden die Zellen geerntet und zur Herstellung von Zelllysaten verwendet. Die IRAK-1- und GAPDH-Level wurden mittels Western Blot sichtbar gemacht.

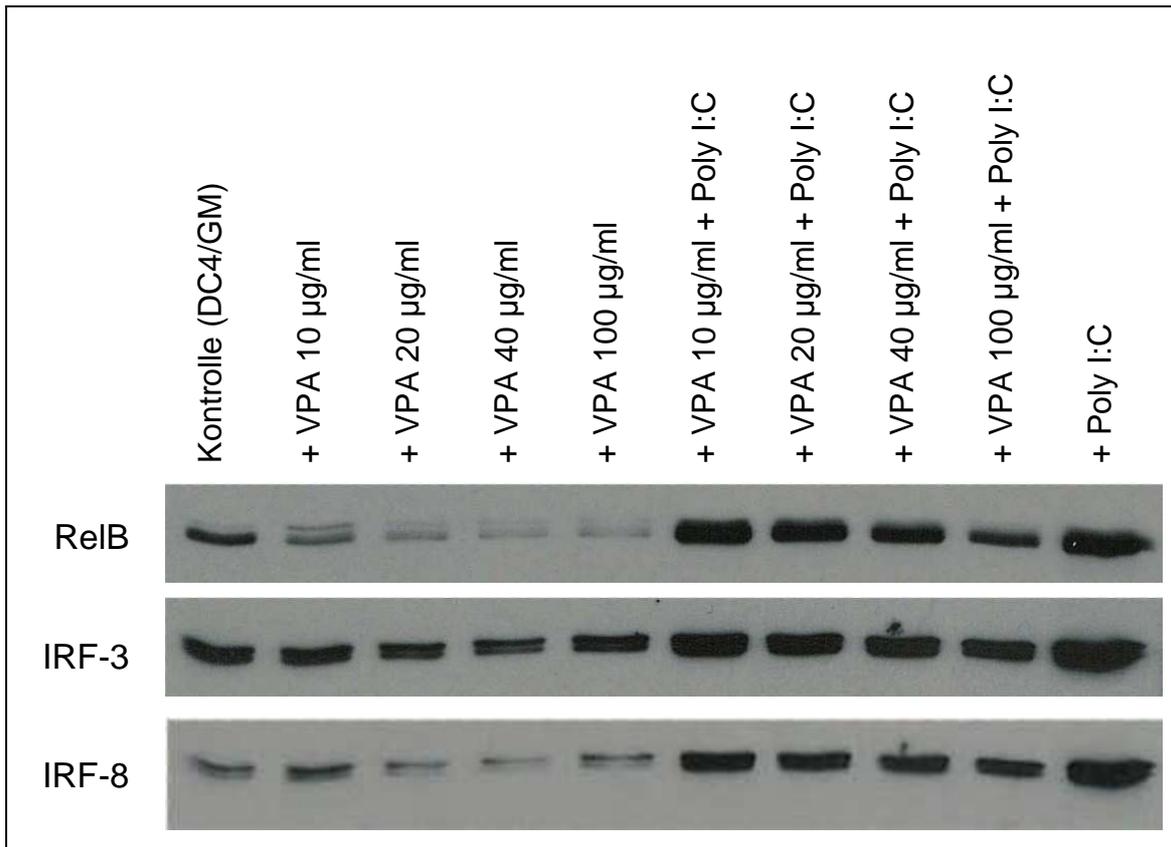


Abb. 3.6.C: VPA beeinträchtigt die Translokation in den Kern von RelB, IRF-3 und IRF-8. Adhärente Monozyten wurden wie in A und B beschrieben behandelt nach dem Ernten zur Herstellung von Kernextrakten verwendet. Im Kern befindliche RelB-, IRF-3- und IRF-8-Level wurden mittels Western Blot sichtbar gemacht.

4 Diskussion

4.1 Fragestellung

Die Epigenetik versucht durch Regulation des Zellstoffwechsels durch Ubiquitylierung, Phosphorylierung, Methylierung und Acetylierung Zellen zu beeinflussen. Am deutlichsten sind hierbei Zellen mit einer hohen Stoffwechselaktivität betroffen, wie zum Beispiel Tumorzellen. Eine dieser Strategien betrifft die Hyperacetylierung bzw. die Hemmung der Deacetylierung der Histon-Proteine. Histone sind maßgeblich für die Struktur des Chromatins im Zellkern verantwortlich. Sind sie deacetyliert, befindet sich das Chromatin in einem kondensierten Zustand, in dem die DNA nicht abgelesen werden kann. Im acetylierten Zustand wird eine offenerere und somit transkriptionell aktivere Form geschaffen.

Histon-Deacetylase-Inhibitoren bewirken eine Hyperacetylierung der Histone und folglich eine übermäßige Transkription. Die Aufhebung des Differenzierungsstopps führte bei akuten Leukämien zur Ausdifferenzierung. Bei anderen malignen Erkrankungen wie T-Zell-Lymphomen scheinen andere Mechanismen eine Rolle zu spielen. Die Wirkung auf solide und hämatologische Malignitäten wird derzeit in Tumor-Zelllinien, Tiermodellen und klinischen Studien weiter untersucht.

In Mausmodellen zeigte sich, dass HDAC-Hemmer neben ihrer Anti-Tumor-Wirkung auch antiinflammatorische Eigenschaften besitzen. So waren die autoimmunen Symptome bei Graft-versus-Host-Erkrankung, systemischem Lupus erythematodes, Concanavalin A-induzierter Hepatitis, experimenteller Autoimmun-Encephalitis, rheumatoider Arthritis sowie Colitis deutlich verbessert.

Als Grund für diese antiinflammatorischen Effekte werden eine Verminderung der Zytokinproduktion, ein Einfluss auf proliferative und zytotoxische Antworten und Störungen bei der Bildung der immunologischen Synapse bei T-Zellen diskutiert. Nicht ausführlich untersucht sind jedoch die Effekte der HDAC-Hemmung auf andere Zellen des Immunsystems, welche möglicherweise noch

tiefgreifender beeinträchtigt werden und so eine eindrucklichere Antwort auf diese Frage geben könnten.

Dendritische Zellen spielen eine Schlüsselrolle bei der Initiierung der Immunantwort. Sie vermitteln zwischen der unspezifischen Immunreaktion z.B. gegen Bakterien und der spezifischen Immunreaktion der T-Zellen, welche diese Pathogene dann gezielt bekämpfen können. Eine Hemmung oder Modulierung der DC-typischen Eigenschaften Antigenpräsentation, Migration, Zytokinproduktion und Stimulierung allogener Zellproliferation führt also zu einer Störung der immunologischen Reaktionskette und müsste folglich in einer Abwehrschwäche oder aber verminderten Autoimmunreaktion resultieren.

Ob nun HDAC-Inhibitoren DCs auf diese Weise beeinflussen und wo genau diese ansetzen, sollte hier untersucht werden.

4.2 Methoden

Monozyten wurden aus Buffy Coats bzw. Leukapherisaten von freiwilligen Spendern isoliert und daraus mittels Zugabe von IL-4 und GM-CSF DCs gezüchtet. Poly I:C als TLR-3-Ligand wurde an Tag 6 zur Gewinnung reifer DCs eingesetzt. Die HDAC-Inhibitoren wurden während des Differenzierungsprozesses in 4 verschiedenen Konzentrationen zugegeben, welche den Bereich der physiologischen Serumkonzentration widerspiegeln. An Tag 7 wurden alle Zellen geerntet.

Mittels FACS-Analyse wurde der Phänotyp bestimmt. Hierbei konnten erste Vermutungen über die verbliebenen Funktionen der DCs gestellt werden. In Migrations-Versuchen, ELISAs und gemischten Leukozytenreaktionen (*mixed leukocyte reaction*, MLR) konnten die DC-Eigenschaften Migration, Zytokinproduktion und Kapazität zur Stimulation allogener Zellproliferation quantifiziert werden. Apoptose-Messungen durch PI-Färbung stellten sicher, dass die gezeigten Defizite nicht durch Apoptose der DCs bedingt sind.

Zur Untersuchung des NF- κ B-Wegs und der IRFs wurden Lysate und Kernextrakte hergestellt und die entsprechenden Proteinkonzentrationen in

Western Blots quantifiziert. Als Ladekontrolle der Lysate wurde die GAPDH verwendet.

Neben dem von mir untersuchten HDAC-Inhibitor Valproat wurde in unserer Arbeitsgruppe auch der Inhibitor MS-275 für die gleichen Experimente verwendet. Auch die mit MS-275 behandelten DCs zeigten einen abnormen Phänotyp und Insuffizienzen in Migration, Zytokinproduktion und Immunstimulation bei erhaltener Viabilität. Die bei MS-275 beobachteten Effekte entsprechen also denen nach Valproat-Behandlung.

Aus den in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Einblicken konnten Rückschlüsse auf den Ansatzpunkt der HDAC-Inhibitoren und den molekularen Grund der defizienten DC-Eigenschaften gezogen werden.

4.3 Diskussion der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Hemmung der HDAC tiefgreifende Auswirkungen auf menschliche dendritische Zellen hat. Werden DCs während ihres Differenzierungsprozesses aus Monozyten mit HDAC-Hemmern behandelt, zeigen sie einen veränderten Phänotyp, eine verminderte Zytokinproduktion, eine herabgesetzte Chemokin-induzierte Migrationsrate und eine reduzierte immunstimulatorische Kapazität. Die hier gezeigten Daten bestätigen somit, dass die Hemmung der HDAC zu Immunsuppression führen könnte, welche sich im Bereich der Antigen präsentierenden Zellen (APC) abspielt.

Interessanterweise haben frühere Studien über die immunologischen Effekte der HDAC-Hemmer auf AML-Zellen gezeigt, dass diese Medikamente den Erwerb der DC-typischen Fähigkeiten fördern und die Expression der kostimulatorischen Moleküle wie CD40, CD80 und CD86 steigern. Ähnliches ist für Zellen des Multiplen Myeloms und des Melanoms beschrieben worden. Der Grund für diese Diskrepanz zwischen den genannten Studien und den hier gezeigten Daten ist unklar. Möglicherweise haben HDACs unterschiedliche Rollen in maligne erkranktem und in gesundem Gewebe. In Tumoren ist die

HDAC-Aktivität regelmäßig dereguliert, was zu einer veränderten Genexpression und damit vielleicht zu Phänotypen führt, die es den malignen Zellen erleichtern, dem Immunsystem zu entfliehen. HDAC-Hemmer könnten dann diese Effekte beseitigen. Andererseits könnten HDAC-Hemmer unter physiologischen Bedingungen in die Differenzierung der dendritischen Zellen eingreifen, indem sie die Feineinstellung der Genexpression beeinflussen und/oder indem sie direkt auf die wichtigen proinflammatorischen Signalkaskaden einwirken, welche über den NF- κ B-Weg und die IRF-Familie laufen.

NF- κ B ist ein Transkriptionsfaktor, der die Expression zahlreicher Entzündungsmediatoren kontrolliert, darunter induzierbare Nitridoxid-Synthase, IL-6, IL-8, IL-10 und IL-12. Die Auswirkungen der HDAC-Hemmung scheinen sowohl komplex zu sein als auch je nach Zelltyp und Kontext der Experimente zu variieren. Über die Blockade der NF- κ B-Transkriptionsaktivität durch HDAC-Hemmer ist berichtet worden, und der vermutete Mechanismus beinhaltet eine beeinträchtigte Translokation von NF- κ B in den Kern sowie die Stabilisierung von I κ B α und die Inhibition des Proteasoms. Andererseits wurde die HDAC-induzierte Aktivierung von NF- κ B auch als Ergebnis einer Hyperacetylierung des RelA-Proteins beschrieben, welche wiederum die Relokalisierung von RelA in den Kern fördert. In den vorliegenden Untersuchungen lag die Aufmerksamkeit hauptsächlich bei RelB, entsprechend seiner Bedeutung in der Biologie der DCs. Die Ergebnisse zeigten eine verminderte Expression von RelB im Kern nach Behandlung der DCs mit HDAC-Hemmern. Dies konnte sowohl unter normalen Bedingungen als auch nach Stimulierung mit dem TLR-Ligand Poly I:C beobachtet werden. Das deutet auf einen wichtigen hemmenden Effekt hin, der sowohl die verminderte Zytokinproduktion als auch die reduzierte immunostimulatorische Kapazität der behandelten DCs erklären könnte. Es ist davon auszugehen, dass die NF- κ B-Aktivierung nach TLR-Stimulation von der Signaltransduktion über MyD88 und IRAK-1 abhängt, wobei berichtet wurde, dass die verlängerte TLR-Stimulation zu einer Herunterregulation von IRAK-1 führt. Dementsprechend deutet die unbeeinträchtigte Herunterregulation von IRAK-1 in Poly I:C-stimulierten DCs

trotz Behandlung mit einem HDAC-Hemmer darauf hin, dass der TLR-Signalweg *upstream* von RelB wahrscheinlich nicht betroffen ist. Das bedeutet, dass im Gegenteil dazu die RelB-Funktion noch stärker von der HDAC-Aktivität abhängen könnte.

Die IRF-Familie ist eine Gruppe Transkriptionsfaktoren, die an der Expression der Typ I-Interferone in Zellen beteiligt ist, die Viren und bakteriellen Pathogenen exponiert sind. Die IRFs werden nicht nur über TLR-Stimulation aktiviert, sondern auch über endogene Signale, wie zum Beispiel den CD40-Ligand und Zytokine. Seit sich herausstellte, dass verschiedene IRFs einschließlich IRF-3 und IRF-8/ICSBP1 für die Generierung, Migrationsfähigkeit und Zytokinproduktion der DCs benötigt werden, misst man dem Interferon-Signalweg eine große Bedeutung für die Funktion Antigen präsentierender Zellen zu. Schon frühere Experimente deuteten eine Rolle der HDAC im Interferon-Signalweg an. Die genaue Funktion der HDACs in diesem Kontext und inwiefern sich HDAC-Hemmer letztlich auf die IRF-Aktivität auswirken, konnte jedoch bisher noch nicht vollständig erklärt werden. Nuzinson und Kollegen haben gezeigt, dass die viral induzierte IFN β -Expression durch den HDAC-Inhibitor Trichostatin A blockiert wird. Dieselben Autoren zeigten weiter, dass, während IRF-3-Aktivierung, Translokation in den Kern und DNA-Bindung nicht durch die Hemmung der HDAC behindert wurden, die HDAC-Aktivität dennoch *downstream* der IRF-3-DNA-Bindung von der IRF-*responsive positive regulatory domain* benötigt wurde. Diese Studie demonstriert letztlich, dass verschiedene HDACs unterschiedlich Einfluss auf IRF-3 und NF- κ B nehmen. Zum Beispiel wird IRF-3 durch die HDAC6 aktiviert, während die HDAC1 und die HDAC8 sowohl die Expression von IRF-3 als auch von NF- κ B vermindern. Dieses Modell wurde jedoch von einem anderen Bericht in Frage gestellt, welcher eine Zunahme der IFN β -Sekretion in Osteoklasten nach HDAC-Hemmung beschrieb. In der vorliegenden Arbeit wurde herausgefunden, dass der HDAC-Inhibitor Valproat die Proteinmenge an IRF-3 und IRF-8 in Kernextrakten reduziert, wobei dieser Effekt am deutlichsten in Poly I:C-stimulierten DCs ist. Die hier gezeigten Daten deuten daher eine tiefgreifende Wirkung der HDAC-Hemmer auf die IRF-Familie an. Vermutlich wird die HDAC-

Aktivität für die Translokation der IRFs in den Kern benötigt, zumindest in diesem Zellmodell. Da sowohl IRF-3 als auch IRF-8 eine Rolle bei der IL-12-Produktion spielen und IRF-8/ICSBP1 für die Migration der dendritischen und Langerhanszellen in den Lymphknoten benötigt wird, würde eine Inhibition der IRF-Funktion durch HDAC-Inhibitoren zur Hemmung von RelB beitragen und damit noch stärker die DC-induzierte Immunantwort schwächen.

4.4 Grenzen

Zum einen darf nicht vergessen werden, dass es sich bei dieser Arbeit um *in vitro*-Experimente handelt. Die untersuchten DCs sind künstlich generiert und allein mit IL-4 und GM-CSF behandelt worden, im Gegensatz zum Zytokincocktail, den man zugeben müsste, um die physiologischen Bedingungen des menschlichen Blutes zu imitieren. Poly I:C ist ein TLR-Ligand, der sehr spezifisch und auf gut erforschtem Wege zur Reifung der DCs führt, jedoch nicht die Bandbreite der Aktivierungsmöglichkeiten im Körper reproduzieren kann. Da DCs sich vor allem im Knochenmark und in lymphatischen Geweben aufhalten, kann nicht mit letzter Sicherheit gesagt werden, ob die dort erreichten HDAC-Inhibitor-Konzentrationen den gemessenen Serumkonzentrationen entsprechen.

Zum anderen wird durch HDAC-Hemmer nicht nur die Acetylierung der Histon-Proteine reguliert. Sie greifen vielmehr auch außerhalb des Zellkerns an und können so vielfältige Effekte hervorrufen. Durch die unterschiedlichen Mechanismen der Hemmung der verschiedenen erhältlichen HDAC-Inhibitoren können die berichteten Ergebnisse nur bedingt auf andere Medikamente dieser Art übertragen werden.

4.5 Schlussfolgerung

Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Daten, dass die Hemmung der HDAC die Differenzierung der DCs beeinträchtigt und diese Antigen präsentierenden Zellen in einen weniger stimulierenden und stimulierten Zustand zurückversetzt. Dieser Effekt wird wahrscheinlich über eine Interferenz mit Signalwegen erreicht, die direkt an der Immunantwort und Biologie der DCs beteiligt sind, einschließlich NF- κ B und IRF-Familie. HDAC-Hemmer könnten daher die anti-mikrobiologische als auch die tumorspezifische Immunantwort schwächen. Andererseits scheinen die HDACs ein viel versprechendes Ziel in der Therapie entzündlicher und autoimmuner Erkrankungen zu sein, wo eine Kontrolle der Immunogenität der DCs erwünscht ist.

5 Zusammenfassung

Histon-Deacetylasen (HDACs) modulieren die Gentranskription und die Chromatinstruktur, indem sie Histon-Proteine auf einer posttranskriptionalen Ebene verändern. HDAC-Hemmer besitzen eine viel versprechende Aktivität gegen Tumoren und werden gegenwärtig in klinischen Studien erforscht. Eine zunehmende Evidenz in Tiermodellen deutet zudem auf immunsuppressive Eigenschaften dieser kleinen Moleküle hin, obwohl die zugrunde liegenden Mechanismen momentan unverstanden sind. Im Laufe dieser Arbeit wurde ein HDAC-Hemmer des klinischen Alltags – Valproat – in seiner Wirkung auf dendritische Zellen (DCs) untersucht.

Die DCs wurden aus Monozyten generiert. Hierfür wurden diese mit GM-CSF und IL-4 inkubiert. Die Reifung der DCs wurde durch die Zugabe von Poly I:C induziert. Es wurden der Phänotyp, die Apoptoserate, die Migrationsfähigkeit, die Kapazität zur Stimulierung allogener Zellen und die Zytokinproduktion der DCs unter Zuhilfenahme der Durchflusszytometrie, *mixed leukocyte reactions* (MLR), ELISAs und Transwell-Versuchen analysiert. Die Translokation von RelB, IRF-3 und IRF-8 in den Kern, sowie die Expression von Bcl-6 und PU.1 wurden mittels Immunoblotting untersucht.

Die Hemmung der HDAC beeinträchtigt die Differenzierung der DCs, indem die Expression des DC-Markers CD1a reduziert und die Expression kostimulatorischer und Adhärenzmoleküle vermindert wird. Des Weiteren sind die MIP-3 β -induzierte Migration, die immunostimulatorische Kapazität, sowie die Zytokinsekretion deutlich beeinträchtigt. Die beobachteten Defekte der DC-Funktionen nach Exposition zu HDAC-Hemmern scheint die Störung der Signalkaskade über NF- κ B, IRF-3 und IRF-8 widerzuspiegeln.

HDAC-Hemmer entwickeln starke immunmodulierende Eigenschaften gegenüber humanen DCs. Die hier gezeigten Ergebnisse unterstützen die genauere Analyse von HDAC-Inhibitoren bei der Behandlung von entzündlichen und autoimmun bedingten Erkrankungen.

6 Literaturverzeichnis

1. Drummond DC, Noble CO, Kirpotin DB, Guo Z, Scott GK, Benz CC. Clinical development of histone deacetylase inhibitors as anticancer agents. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005;45: 495-528.
2. Minucci S, Pelicci PG. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat Rev Cancer* 2006;6: 38-51.
3. Piekarz RL, Pobey R, Sandor V, Bakke S, Wilson WH, Dahmouch L, Kingma DM, Turner ML, Altemus R, Bates SE. Inhibitor of histone deacetylation, depsipeptide (FR901228), in the treatment of peripheral and cutaneous T-cell lymphoma: a case report. *Blood* 2001;98: 2865-2868.
4. Kuendgen A, Schmid M, Schlenk R, Knipp S, Hildebrandt B, Steidl C, Germing U, Haas R, Dohner H, Gattermann N. The histone deacetylase (HDAC) inhibitor valproic acid as monotherapy or in combination with all-trans retinoic acid in patients with acute myeloid leukaemia. *Cancer* 2006;106: 112-119.
5. Reddy P, Maeda Y, Hotary K, Liu C, Reznikov LL, Dinarello CA, Ferrara JL. Histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid reduces acute graft-versus-host disease and preserves graft-versus-leukaemia effect. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101: 3921-3926.
6. Leng C, Gries M, Ziegler J, Lokshin A, Mascagni P, Lentzsch S, Mapara MY. Reduction of graft-versus-host disease by histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid is associated with modulation of inflammatory cytokine milieu and involves inhibition of STAT1. *Exp Hematol* 2006;34: 776-787.
7. Camelo S, Iglesias AH, Hwang D, Due B, Ryu H, Smith K, Gray SG, Imitola J, Duran G, Assaf B, Langley B, Khoury SJ, Stephanopoulos G, De Girolami U, Ratan RR, Ferrante RJ, Dangond F. Transcriptional therapy with the histone deacetylase inhibitor trichostatin A ameliorates experimental autoimmune encephalitis. *J Neuroimmunol* 2005;164: 10-21.
8. Chung YL, Lee MY, Wang AJ, Yao LF. A therapeutic strategy uses histone deacetylase inhibitors to modulate the expression of genes involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Mol Ther* 2003;8: 707-717.
9. Glauben R, Batra A, Fedke I, Zeitz M, Lehr HA, Leoni F, Mascagni P, Fantuzzi G, Dinarello CA, Siegmund B. Histone hyperacetylation is associated with amelioration of experimental colitis in mice. *J Immunol* 2006;176: 5015-5022.

10. Leoni F, Zaliani A, Bertolini G, Porro G, Pagani P, Pozzi P, Dona G, Fossati G, Sozzani S, Azam T, Bufler P, Fantuzzi G, Goncharov I, Kim SH, Pomerantz BJ, Reznikov LL, Siegmund B, Dinarello CA, Mascagni P. The antitumor histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid exhibits antiinflammatory properties via suppression of cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99: 2995-3000.
11. Reilly CM, Mishra N, Miller JM, Joshi D, Ruiz P, Richon VM, Marks PA, Gilkeson GS. Modulation of renal disease in MRL/lpr mice by suberoylanilide hydroxamic acid. *J Immunol.* 2004;173: 4171-4178.
12. Serrador JM, Cabrero JR, Sancho D, Mittelbrunn M, Urzainqui A, Sanchez-Madrid F. HDAC6 deacetylase activity links the tubulin cytoskeleton with immune synapse organization. *Immunity.* 2004;20: 417-428.
13. Brogdon JL, Xu Y, Szabo SJ, An S, Buxton F, Cohen D, Huang Q. Histone deacetylase activities are required for innate immune cell control of Th1 but not Th2 effector cell function. *Blood* 2007;109: 1123-1130.
14. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Puledran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2000;18: 767-811.
15. Reis e Sousa C. Activation of dendritic cells: translating innate into adaptive immunity. *Curr Opin Immunol.* 2004;16: 21-25.
16. Beutler B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature.* 2004;430: 257-263.
17. Chen M, Wang YH, Wang Y, Huang L, Sandoval H, Liu YJ, Wang J. Dendritic cell apoptosis in the maintenance of immune tolerance. *Science.* 2006;311: 1160-1164.
18. Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med.* 1994;179: 1109-1118.
19. Nencioni A, Grunebach F, Zobywalski A, Denzlinger C, Brugger W, Brossart P. Dendritic cell immunogenicity is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor γ . *J Immunol.* 2002;169: 1228-1235.
20. Nencioni A, Lauber K, Grunebach F, Brugger W, Denzlinger C, Wesselborg S, Brossart P. Cyclopentenone prostaglandins induce caspase activation and apoptosis in dendritic cells by a PPAR- γ -independent mechanism: regulation by inflammatory and T cell-derived stimuli. *Exp Hematol.* 2002;30: 1020-1028.

21. Brossart P, Zobywalski A, Grunebach F, Behnke L, Stuhler G, Reichardt VL, Kanz L, Brugger W. Tumor necrosis factor α and CD40 ligand antagonize the inhibitory effects of interleukin 10 on T-cell stimulatory capacity of dendritic cells. *Cancer Res.* 2000;60: 4485-4492.
22. Appel S, Mirakaj V, Bringmann A, Weck MM, Grunebach F, Brossart P. PPAR- γ agonists inhibit toll-like receptor mediated activation of dendritic cells via the MAP kinase and NF- κ B pathways. *Blood.* 2005;106: 3888-3894.
23. Bruni J, Wilder BJ, Willmore LJ, Perchalski RJ, Villarreal HJ. Steady-state kinetics of valproic acid in epileptic patients. *Clin Pharmacol Ther.* 1978;24: 324-332.
24. Ryan QC, Headlee D, Acharya M, Sparreboom A, Trepel JB, Ye J, Figg WD, Hwang K, Chung EJ, Murgo A, Melillo G, Elsayed Y, Monga M, Kalnitskiy M, Zwiebel J, Sausville EA. Phase I and pharmacokinetic study of MS-275, a histone deacetylase inhibitor, in patients with advanced and refractory solid tumors or lymphoma. *J Clin Oncol.* 2005;23: 3912-3922.
25. Laribee RN, Klemsz MJ. Loss of PU.1 expression following inhibition of histone deacetylases. *J Immunol.* 2001;167: 5160-5166.
26. Guerriero A, Langmuir PB, Spain LM, Scott EW. PU.1 is required for myeloid-derived but not lymphoid-derived dendritic cells. *Blood.* 2000;95: 879-885.
27. Iwama A, Osawa M, Hirasawa R, Uchiyama N, Kaneko S, Onodera M, Shibuya K, Shibuya A, Vinson C, Tenen DG, Nakauchi H. Reciprocal roles for CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) and PU.1 transcription factors in Langerhans cell commitment. *J Exp Med.* 2002;195: 547-558.
28. O'Connor OA. Targeting histones and proteasomes: new strategies for the treatment of lymphoma. *J Clin Oncol.* 2005;23: 6429-6436.
29. Toney LM, Cattoretti G, Graf JA, Merghoub T, Pandolci PP, Dalla-Favera R, Ye BH, Dent AL. BCL-6 regulates chemokine gene transcription in macrophages. *Nat Immunol.* 2000;1: 214-220.
30. Yu RY, Wang X, Pixley FJ, Yu JJ, Dent AL, Broxmeyer HE, Stanley ER, Ye BH. BCL-6 negatively regulates macrophage proliferation by suppressing autocrine IL-6 production. *Blood.* 2005;105: 1777-1784.
31. Dai Y, Rahmani M, Dent P, Grant S. Blockade of histone deacetylase inhibitor-induced RelA/p65 acetylation and NF- κ B activation potentiates apoptosis in leukemia cells through a process mediated by oxidative damage, XIAP downregulation, and c-Jun N-terminal kinase 1 activation. *Mol Cell Biol.* 2005;25: 5429-5444.
32. Chen LF, Fischle W, Verdin E, Greene WC. Duration of nuclear NF- κ B action regulated by reversible acetylation. *Science.* 2001;293: 1653-1657.

33. Burkly L, Hession C, Ogata L, Reilly C, Marconi LA, Olson D, Tizard R, Cate R, Lo D. Expression of relB is required for the development of thymic medulla and dendritic cells. *Nature*. 1995;373: 531-536.
34. Wu L, D'Amico A, Winkel KD, Suter M, Lo D, Shortman K. RelB is essential for the development of myeloid-related CD8alpha- dendritic cells but not of lymphoid-related CD8alpha+ dendritic cells. *Immunity*. 1998;9: 839-847.
35. Pettit AR, Quinn C, MacDonald KP, Cavanagh LL, Thomas G, Townsend W, Handel M, Thomas R. Nuclear localization of RelB is associated with effective antigen-presenting cell function. *J Immunol*. 1997;159: 3681-3691.
36. Koski GK, Lyakh LA, Cohen PA, Rice NR. CD14+ monocytes as dendritic cell precursors: diverse maturation-inducing pathways lead to common activation of NF-kappaB/RelB. *Crit Rev Immunol*. 2001;21: 179-189.
37. Nusinzon I, Horvath CM. Positive and negative regulation of the innate antiviral response and beta interferon gene expression by deacetylation. *Mol Cell Biol*. 2006;26: 3106-3113.
38. Nakamura T, Kukita T, Shobuike T, Nagata K, Wu Z, Ogawa K, Hotokebuchi T, Kohashi O, Kukita A. Inhibition of histone deacetylase suppresses osteoclastogenesis and bone destruction by inducing IFN-beta production. *J Immunol*. 2005;175: 5809-5816.
39. Macagno A, Molteni M, Rinaldi A, Bertoni F, Lanzavecchia A, Rossetti C, Sallusto F. A cyanobacterial LPS antagonist prevents endotoxin shock and blocks sustained TLR4 stimulation required for cytokine expression. *J Exp Med*. 2006;203: 1481-1492.
40. Schiavoni G, Mattei F, Sestili P, Borghi P, Venditti M, Morse HC 3rd, Belardelli F, Gabriele L. ICSBP is essential for the development of mouse type I interferon-producing cells and for the generation and activation of CD8alpha(+) dendritic cells. *J Exp Med*. 2002;196: 1415-1425.
41. Gautier G, Humbert M, Deauvieu F, Scuiller M, Hiscott J, Bates EE, Trinchieri G, Caux C, Garrone P. A type I interferon autocrine-paracrine loop is involved in Toll-like receptor-induced interleukin-12p70 secretion by dendritic cells. *J Exp Med*. 2005;201: 1435-1446.
42. Schiavoni G, Mattei F, Borghi P, Sestili P, Venditti M, Morse HC 3rd, Belardelli F, Gabriele L. ICSBP is critically involved in the normal development and trafficking of Langerhans cells and dermal dendritic cells. *Blood*. 2004;103: 2221-2228.
43. Moldenhauer A, Frank RC, Pinilla-Ibarz J, Holland G, Boccuni P, Scheinberg DA, Salama A, Seeger K, Moore MA, Nimer SD. Histone deacetylase inhibition improves dendritic cell differentiation of leukemic blasts with AML1-containing fusion proteins. *J Leukoc Biol*. 2004;76: 623-633.

44. Suzuki M, Shinohara F, Sato K, Taniguchi T, Takada H, Rikiishi H. Interleukin-1beta converting enzyme subfamily inhibitors prevent induction of CD86 molecules by butyrate through a CREB-dependent mechanism in HL60 cells. *Immunology*. 2003;108: 375-383.
45. Khan AN, Magner WJ, Tomasi TB. An epigenetically altered tumor cell vaccine. *Cancer Immunol Immunother*. 2004;53: 748-754.
46. Catley L, Weisberg E, Tai YT, Atadja P, Remiszewski S, Hideshima T, Mitsiades N, Shringarpure R, LeBlanc R, Chauhan D, Munshi NC, Schlossman R, Richardson P, Griffin J, Anderson KC. NVP-LAQ824 is a potent novel histone deacetylase inhibitor with significant activity against multiple myeloma. *Blood*. 2003;102: 2615-2622.
47. Place RF, Noonan EJ, Giardina C. HDAC inhibition prevents NF-kappa B activation by suppressing proteasome activity: down-regulation of proteasome subunit expression stabilizes I κ B α . *Biochem. Pharmacol*. 2005;70: 394-406.
48. Wathelet MG, Lin CH, Parekh BS, Ronco LV, Howley PM, Maniatis T. Virus infection induces the assembly of coordinately activated transcription factors on the IFN- β enhancer in vivo. *Mol Cell*. 1998;1: 507-518.
49. Kuwata T, Gongora C, Kanno Y, Sakaguchi K, Tamura T, Kanno T, Basrur V, Martinez R, Appella E, Golub T, Ozato K. γ interferon triggers interaction between ICSBP (IRF-8) and TEL, recruiting the histone deacetylase HDAC3 to the interferon-responsive element. *Mol Cell Biol*. 2002;22: 7439-7448.

7 Danksagung

Danken möchte ich:

- Herrn Prof. Dr. Peter Brossart für die Bereitstellung des Themas, die ausgezeichnete Betreuung und für seine Ratschläge und Unterstützung in allen Lebenslagen.
- Sylvia Stephan für die geduldige Einarbeitung und das unermüdliche Beantworten aller Fragen.
- Bruni Schuster und Solveig Daecke für die technische Unterstützung und ihre gute Laune.
- Katharina Brauer und Anita Bringmann für ihre Hilfe beim Wettlauf der Proteine und die Aufmunterungen.
- Alex Schaub und Yuko Yokoyama für ihre Ablenkungen und viel Gelächter.
- Frank Grünebach, Regina Heselmaier, Karin von Schwarzenberg, Markus Weck, Daniela Werth, Steffi Held und Madeleine Hipp für die gute Stimmung, viele Ratschläge, Kaffee und Kuchen und für den begehrten September-Mann.
- Meinen Eltern für ihre Unterstützung, ihre Geduld, ihre Fürsorge und für ihren Glauben an mich und meine Fähigkeiten und besonders meinem Vater für sein Interesse, seine Begeisterungsfähigkeit und sein großes Wissen, das er immer gerne mit mir teilt.
- Kerstin für die lustige Kindheit und die vielen Aufgaben vor die sie mich stellt, damit ich immer wieder über mich hinaus wachsen kann.
- Stephan, Katrin, Christian, Carina, Sylvia, Joe und Flo für ihre Freundschaft, eine wundervolle Studienzeit, tiefgehende Gespräche, Anstöße zum Umdenken, Aufmunterungen und viele lustige Abende.
- Meinem Semester und allen Personen, die mein Leben begleiten und begleitet haben.

8 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Julia Beck
Geburtsdatum: 09. Februar 1984
Geburtsort: Ludwigsburg

Schulbildung:

1990 – 1994 Grundschule Kleinsachsenheim
1994 – 2003 Ellental-Gymnasien Bietigheim-Bissingen
Juli 2003 Abitur

Hochschulbildung:

Okt. 2003 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Eberhard Karls Universität Tübingen
Sep. 2005 Ärztliche Vorprüfung
5. Nov. 2009 Ärztliche Prüfung (Staatsexamen)

Promotion:

Okt. 2005 Beginn der Doktorarbeit bei Prof. Dr. P. Brossart, Abteilung für Hämatologie, Onkologie, Immunologie, Rheumatologie und Pulmologie, Universitätsklinik Tübingen
Titel: Regulation der Funktion Dendritischer Zellen durch Histon-Deacetylase-Inhibitoren
Nov. 2006 Posterpräsentation der Ergebnisse meiner Doktorarbeit auf der Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie in Leipzig
Dez. 2006 Posterpräsentation der Ergebnisse meiner Doktorarbeit auf der Jahrestagung der Amerikanischen Gesellschaft für Hämatologie in Orlando, FL, USA

1. Juli 2007 Veröffentlichung der Ergebnisse meiner Doktorarbeit:
Nencioni A, Beck J, Werth D, Grünebach F, Patrone F,
Ballestrone A, Brossart P. Histone deacetylase inhibitors
affect dendritic cell differentiation and immunogenicity. Clin
Cancer Res. 2007;13: 3933-3941

Arbeitserfahrung:

2006 Famulatur in der Chirurgischen Notfallambulanz des
Krankenhauses Bietigheim-Bissingen

Okt. 2006 Beginn der Beschäftigung als wissenschaftliche Hilfskraft
zur Dokumentation klinischer Studien an der
Universitätsklinik Tübingen, Abteilung für Hämatologie,
Onkologie, Immunologie, Rheumatologie und Pulmologie

2007 Famulatur in der Hämatologie/Onkologie der
Universitätsklinik Tübingen

2007 Famulatur am Porter Memorial Hospital Valparaiso,
Indiana, USA

Stipendien:

Jan. – Juli 2006 Stipendium des Graduiertenkollegs 794 „Zellbiologische
Mechanismen Immunassoziierter Prozesse“ der Universität
Tübingen

Preise:

Juli 2003 Schulpreis der Gymnasien im Ellental für ganz besondere
Leistungen im Fach Deutsch

Dez. 2006 Travelaward der Amerikanischen Gesellschaft für
Hämatologie